

Chemoenzymatische Modifikation von nativen und hydrolysierten Sophoroselipiden

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Dipl.-Chem. Sabine Hammen
aus Herford

1. Referent: PD Dr. U. Rau

2. Referent: Prof. Dr. K. D. Vorlop

eingereicht am: 17.02.2003

mündliche Prüfung Disputation am : 18.06.2003

2003

(Druckjahr)

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Priv. Doz. Dr. U. Rau, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Hammen, S., Heckmann, R., Langer, O., Wray, V., Lang, S., (2000). Veredlung pflanzlicher Öle durch enzymatische Modifizierung biotechnisch gewonnener Tenside. In: *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe 1999*, in: *Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“*, Vol. **15** (Hrg. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow), LV-Druck, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, S. 99-107.

Rau U, Hammen S, Heckmann R, Wray V, Lang S (2001) Sophorolipids: A source for novel compounds. *Ind Crops Prod* **13**, S. 85-92

Vorträge

Hammen, S., Heckmann, R., Langer, O., Wray, V., Lang, S., und Rau, U. (1999), Veredlung pflanzlicher Öle durch enzymatische Modifizierung biotechnisch gewonnener Tenside. 2. Workshop Biokonversion Nachwachsender Rohstoffe, Braunschweig, 14-15.10.1999

Lang, S., Hammen, S., Heckmann, R., Langer, O., Vollbrecht, E. und Rau, U. (2000): Glycolipids: Studies on their microbial production, chemoenzymatic modification and properties. In: *Proceedings of the Minisymposium on „New syntheses with oil and fats as renewable raw materials for the Chemical Industry“*, Oldenburg 14.06.2000 (Organisation: J.O. Metzger), S. 5.

Lang, S., Langer, O., Vollbrecht, E., Hammen, S., Heckmann, R., und Rau, U. (2000): Production and modification of microbial glycolipids. Joint international Congress and Expo „*Lipids, Fats and Oils: Opportunities and responsibilities in the new century*“, (Organisation: DGF, Association Francaise pour l'etude des corps gras), Würzburg, 08.-10.10.2000.

Hammen, S., Heckmann, R., Langer, O., Wray, V., und Rau, U. (2000): Sophorolipids – a source for value added compounds. Joint international Congress and Expo „*Lipids, Fats and Oils: Opportunities and responsibilities in the new century*“, (Organisation: DGF, Association Francaise pour l'etude des corps gras), Würzburg, 08.-10.10.2000.

Poster

Hammen, S., Heckmann, R., Wray, V., Lang, S., und Rau, U. (1999), Production and modification of microbial sophorolipids. Proceedings of the 6th Symp. on “*Renewable Resources for Chemical Industry*” (Bonn, 23.-25.03.1999).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig unter der Leitung von PD Dr. U. Rau angefertigt.

Für die Finanzierung dieser Arbeit innerhalb des BML-Verbundprojektes "Biotenside und Folgeprodukte aus Triglyceriden/Kohlenhydraten" (Kennzeichen: 97NR172-F) danke ich dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft und der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (Gülzow).

Herrn Dr. U. Rau danke ich besonders für die interessante Themenstellung, sowie die Förderung und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. K.-D. Vorlop danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. S. Lang danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, für seine Organisation von interessanten Kontakten außerhalb des Institutes und für die stets freundliche und produktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. V. Wray und seinem Team danke ich herzlich für die Aufnahme der komplexen NMR-Spektren und für seine Hilfe bei der Interpretation des umfangreichen Spektrenmaterials.

Herrn Dr. M. Nimtz und Herrn Dr. S. Schulz und seinem Team danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und die Unterstützung bei der Auswertung dieser Spektren.

Herrn Prof. W. Beil danke ich für die Durchführung der pharmazeutischen Tests.

Herrn Dr. R. Heckmann danke ich sehr herzlich für seine wertvollen Diskussionen, seine umfangreiche Arbeit und fachliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen Detlev Rasch und Anke Dieringer für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Rau, für ihre fachliche und technische Unterstützung und die zahlreichen interessanten Diskussionen auch abseits der Biotechnologie.

Für die stets gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima danke ich den Praktikanten, den studentischen Hilfskräften und allen Mitarbeitern der Abteilung Biotechnologie insbesondere Verena Lurtz, Olaf Langer, Elke Vollbrecht, Werner Ramm, Stefan Weferling, Wolfgang Graßl, Andrea Walzog und Margret Hesse.

Meinen Eltern danke ich für ihre vielseitige Unterstützung.

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Chemikalien und Enzyme	6
2.1.1 Enzyme	6
2.1.2 Lösungsmittel	7
2.1.3 Feststoffe	7
2.1.4 Säuren/Katalysatoren	7
2.1.5 Öle	8
2.1.6 Standards	8
2.2 Analytische Methoden	8
2.2.1 Glukose	8
2.2.2 Phosphat	9
2.2.3 Ammonium	9
2.2.4 Peroxid	9
2.2.5 Biomasse	9
2.2.6 Ölsäure	9
2.2.7 Rapsöl	10
2.2.8 Sophoroselipide	10
2.2.9 Enzymkinetik	10
2.2.9.1 Linearisierung nach Lineweaver-Burk	14
2.2.9.2 Linearisierung nach Eadie-Hofstee	15
2.2.9.3 Linearisierung nach Dixon-Hanes-Woolf	16
2.3 Chromatografische Methoden	17
2.3.1 Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatografie (MPLC)	17
2.3.2 Dry-Flash-Chromatografie (DFC)	19
2.3.3 stationäre Phasen	21
2.3.4 Sprühreagenzien	21
2.3.5 präparative Säulen	22
2.3.6 Quantitative Dünnschicht-Chromatografie	22

2.4 Spektroskopische Methoden	22
2.4.1 EI-Massenspektroskopie	22
2.4.2 FAB-Massenspektroskopie	23
2.4.3 Gaschromatografie-Massenspektroskopie (GC-MS)	23
2.4.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	23
2.5 Pharmazeutische Tests	24
2.6 Gewinnung der Sophoroselipide mittels <i>Candida bombicola</i>	25
2.7 Chemische Methylierung	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Aufarbeitung des Sophoroselipid-Rohextraktes	27
3.1.1 Alkalische Verseifung	27
3.1.2 Aufreinigung der Sophoroselipid-Säuren mittels präparativer Mitteldruck-Chromatografie (MPLC)	31
3.1.3 Überprüfung der Reinheit der SLS-DEAC 18:1 mittels FAB-MS	32
3.2 Chemisches Screening	33
3.2.1 Vorversuche mit anorganischen Säuren	33
3.3 Optimierung der Glukoselipid-Säure-Herstellung	38
3.3.1 Temperatureinfluss	39
3.3.2 Einfluss der Substratkonzentration	41
3.3.3 Kinetik	43
3.4 Enzymatische Hydrolyse der SLS-DEAC 18:1	46
3.4.1 Vorversuche mit verschiedenen Hydrolasen	46
3.4.2 Umsetzung der SLS-DEAC 18:1 mittels verschiedener β -Glukosidasen	47
3.4.3 Bestimmung der Stereochemie der Reaktion	49
3.4.4 Isolierung der (ω -1)-OH-Fettsäure	52

3.5 Gewinnung der (ω-1)-OH-Fettsäure 18:1 im g-Maßstab	53
3.5.1 Chemische Hydrolyse der SLS- DEAC 18:1 mit 2N HCl in Dioxan	53
3.5.2 Enzymatische Hydrolyse der SLS-DEAC 18:1	54
3.5.2.1 Einfluß der Sulfataseaktivität verschiedener Glucuronidasen aus <i>Helix pomatia</i> auf die Freisetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1	54
3.5.2.2 Umsetzung von SLS-DEAC 18:1 mittels Glucuronidase Typ HP-2 aus <i>Helix pomatia</i> bzw. Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	58
3.6 Enzymatische Lactonisierung der (ω-1)-OH-Fettsäure 18:1	61
3.6.1 Enzymscreening	61
3.6.2 Quantifizierung der Lactonbildung	62
3.6.3 Stereochemie der Lactonisierung	63
3.6.4 Lactonisierung der (ω -1)-OH-Fettsäure mittels C.A. _{imm} im g-Maßstab	65
3.7 Epoxidierung	69
3.8 Epoxidierung des Lactons durch Zyklisierung der epoxidierten (ω-1)-OH-Fettsäure 18:1	74
3.9 Chirale Dünnschicht-Chromatografie	76
3.10 Pharmazeutische Tests	79
4. Diskussion	81
4.1 Produktspektrum mikrobiell gewonnener Sophoroselipide	81
4.2 Aufarbeitung mikrobiell gewonnener Sophoroselipide	82
4.3 Modifikation der Sophoroselipide	85
4.4 Chemische Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1)	89

4.5 Enzymatische Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1)	90
4.5.1 Aufarbeitung des Reaktionsgemisches	90
4.5.2 Einteilung der Glukosidasen	91
4.5.3 Substratspezifität	96
4.5.4 Stereospezifität	98
4.5.5 Mechanismus	98
4.5.5.1 Spezifität und Mutation	101
4.5.5.2 Einfluss des Substrates auf den Reaktionsmechanismus	102
4.5.5.3 Stereospezifische Freisetzung der Hydroxyfettsäure	104
4.6 Lactonisierung	105
4.6.1 Synthese	105
4.6.2 Mechanismus der enzymatischen Lactonbildung	110
4.7 Epoxidierung	112
4.7.1 Reaktionsbedingungen	112
4.7.2 Mechanismus der chemoenzymatischen Epoxidation	115
4.8 Pharmazeutische Tests	117
4.9 Spektroskopische Daten	117
5. Zusammenfassung	120
6. Literaturhinweise	122
7. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	142

1. Einleitung

Zahlreiche Hefen, Pilze und Bakterien sind in der Lage, auf Kohlenwasserstoffen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen [1], [2], [3]. Diese Mikroorganismen nutzen die ihnen angebotenen Nährstoffe, indem sie diese z. B. durch Produktion von extrazellulären Tensiden ihrem Stoffwechsel zugänglich machen.

Diese verschiedenen ober- und grenzflächenaktiven Substanzen, deren Strukturen in Abhängigkeit der zur Kultivierung verwendeten Substrate variieren, werden auch als Biotenside bezeichnet.

Zu den bekannten Biotensiden zählen die Sophoroselipide (SL). Ihre Tensideigenschaften beruhen auf dem amphiphilen Charakter ihrer Verbindungen. So besitzen die SL einen hydrophilen Kohlenhydratanteil und einen lipophilen Fettsäureanteil. Die Zuckerkomponente besteht aus zwei β 1'',2' -verknüpften Glukosemolekülen (Sophorose). Die primären Hydroxylgruppen in Position 6' und/oder 6'' können dabei acetyliert sein. Der lipophile Teil mikrobiell gewonnener SL besteht aus einer Fettsäure, die über eine β -glukosidische Bindung mit der Sophorose verknüpft sein kann. Die Kettenlänge variiert hauptsächlich zwischen 16 und 20 Kohlenstoffatomen. Des weiteren können bis zu drei Doppelbindungen [4] enthalten sein. Die Position der Hydroxylgruppe der Fettsäure in ω oder $\omega-1$ Stellung (vorletzte Position vom Kohlenwasserstoffkettenende) zu finden. Die neutralen SL besitzen eine zyklische Struktur und sind intramolekular über die Alkoholgruppe der Fettsäure mit einer der Hydroxylgruppen der Sophorose in 1'-4'', 1'-6'' oder 1'-6' Stellung verbunden. In der anionischen Form liegt der lipophile Teil unverestert als Carbonsäure vor. Die Produktzusammensetzung ist von den Kultivierungsbedingungen und dem verwendeten Substraten abhängig. Abb. 1 zeigt das Produktspektrum mikrobieller SL aus einer Rapsöl/Glukose-Kultivierung mittels *Candida bombicola* [4].

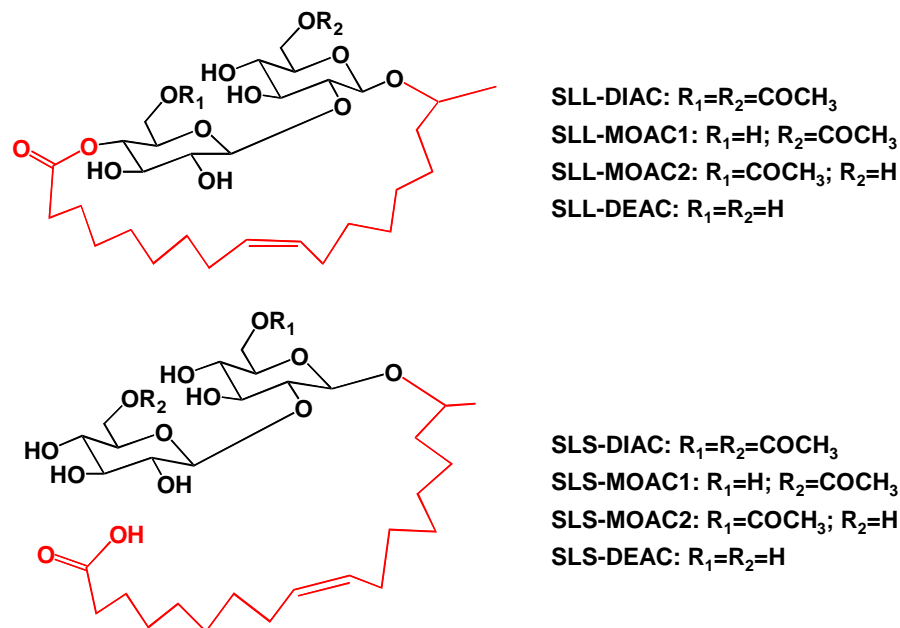


Abb. 1: Struktur mikrobieller Sophoroselipide (SL) aus der Rapsöl/Glukose-Kultivierung mittels *Candida bombicola*. Überwiegend wird hier als Fettsäureanteil (rot) die 17-Hydroxy-Ölsäure eingebaut.

Zur Gewinnung von SL wurden hauptsächlich die Hefen *Candida (Torulopsis) bombicola* und *Candida magnoliae* [5] verwendet. Die erstere wurde aus den Pollensäcken der Hummel isoliert. Daher auch der Name *bombicola*, der von *bombus* der Artenbezeichnung von Hummeln herrührt [6]. Die letztere (*Candida magnoliae*) wurde aus nektarreichen Blüten isoliert [5].

Das kommerzielle Interesse an Biotensiden steigt. Sie sind biologisch abbaubar, unterstützen den mikrobiellen Abbau von Phenanthrenen [7] und sind im allgemeinen weniger toxisch [8], [9]. Zu ihrer Herstellung können Industrieabfälle wie Molke [10], deproteinierter Weizen [11] oder nachwachsende Rohstoffe wie Glukose aus Zuckerrüben [12] und/oder pflanzliche Öle [13], [14] genutzt werden.

Nachwachsende Rohstoffe sind per Definition land- und forstwirtschaftlich erzeugte Produkte, die einer Verwendung im Nichtnahrungsbereich zugeführt werden. Sie sind weitgehend CO_2 neutral. Bei ihrer Nutzung bewirkt das freigesetzte Koh-

lendioxid keinen zusätzlichen Treibhauseffekt. Des weiteren bieten sie die Möglichkeit einer Kreislaufwirtschaft. Der Landwirtschaft werden durch nachwachsende Rohstoffe Produktions- und Einkommensalternativen geboten, die in ländlichen Gebieten Arbeitsplätze erhalten und neue schaffen.

Im Jahr 2002 wurden 11,8 Mill. ha Bodenfläche als Ackerland genutzt. Das ist 33% der Fläche Deutschlands. Insbesondere der Raps ist auf dem Vormarsch. Sein Anbau wurde gegenüber 2001 um 160 000 ha auf insgesamt 1,28 Mill. ha ausgedehnt. Das entspricht einem Anstieg von 14,3% [15].

Biotenside waren gegenüber konventionellen synthetischen Tensiden lange Zeit aufgrund ihrer hohen Herstellungspreise unterlegen. Ziel der Forschung war es deshalb, hohe Produktmengen zu ermöglichen. So konnte die von Gorin *et al.* 1961 [16] publizierte Produktivität von 0,21 g SL/L*h auf 2,4 g SL/L*h [14] mit Glukose/Rapsöl gesteigert werden (Tab. 1).

Die hohen Produktivitäten der Hefe *Candida bombicola* stellen eine extreme Überproduktion dar, die möglicherweise den Abbau von Energie aus überschüssigem Substratkohlenstoff [17] oder den Zugang hydrophober Nährstoffe gewährleistet [18],[19]. Eine Abgrenzung des Biotops aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften der SL gegenüber anderen Mikroorganismen [20] ist auch denkbar.

Da es sich bei dem Waschmittelbereich um sogenannte „bulk-products“ mit geringen Gewinnspannen handelt, wurde nach industriellen Anwendungen mit höherer Wertschöpfung gesucht. Diese sind vor allem im Kosmetik- [21-24],[25], [4] und Pharmabereich [20], [26] zu finden.

Nachdem die antimikrobiellen und antitumoralen Eigenschaften der Sophoroselipide nachgewiesen wurden, ist das nächste Ziel der pharmakologischen Untersuchungen die Bestimmung einer Leitstruktur. Dazu sind die Isolierung und Aufreinigung einzelner Sophoroselipide notwendig.

Die stickstofflimitierte Kultivierung von *Candida bombicola* führte nach alkalischer Hydrolyse hauptsächlich zu einer deacetylierten offenen Sophoroselipidform (SLS-DEAC) [27]. Unter Verwendung von Glukose/Rapsöl als Kohlenstoffquelle

wurde die Hydroxygruppe hauptsächlich an der ω -1 Stellung der Fettsäure eingeführt.

Ziel dieser Arbeit war die Modifikation dieser Hauptkomponente, um damit einen Pool aus neuen Substanzen mit verbesserten Eigenschaften zu generieren. Dazu war zunächst ein Verfahren zu entwickeln, dass die Bereitstellung einer genügenden Menge an nativem Produkt (SLS-DEAC 18:1) gewährleistete. Insbesondere die Freisetzung der synthetisch nur schwer darstellbaren und optisch aktiven (ω -1)-Hydroxy-Ölsäure war ein Schwerpunkt. Die Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure sollte dazu durch den Einsatz von Enzymen hinsichtlich ihrer Ausbeute und Stereospezifität optimiert werden. Die eingesetzten Glukosidasen sollten auf ihre endo-Aktivität die Sophorose abzuspalten, untersucht werden. Des weiteren stand die chemoenzymatische Herstellung von Hydroxyfettsäuren, Makrolactonen sowie deren Epoxidierung im Vordergrund. Sie sollten unter anderem als Ausgangsverbindungen zur Herstellung von Produkten mit höherer Wertschöpfung dienen. Neue Einsatzmöglichkeiten in der Kosmetik- oder Pharmaindustrie sollten getestet werden.

Tab. 1: Sophoroselipid-Produktivität aus Batch-Kultivierungen mit verschiedenen Substraten

Referenz	Substrat	Sophoroselipid-Konzentration [g/L]	Kultivierungsdauer [h]	Produktivität [g/L*h]
[16]	Glukose	50	240	0,21
[29]	Glukose/Sonnenblumenöl	70	144	0,49
[30]	Glukose/Fettsäureester aus Rapsöl	320	200	1,6
[31]	Glukose/Diestelöl	132	264	0,5
[32]	Glukose/Sojaöl	120	120	1
[33]	Glukose/Ölsäure	180	200	0,9
[34]	Glukose/Rapsöl	364	168	2,17
[35]	deproteiniertes Weizen/Rapsöl	280	280	1
[36]	Glukose/Sonnenblumenöl	120	192	0,63
[14]	Glukose/Rapsöl	300	125	2,4
[37]	Glukose/n-Hexadecan	60	250	0,24
[38]	Glukose/Ölsäure	350	168	1-1,5

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

2.1.1 Enzyme

- β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* (Sigma, München)
- β -Glukosidase aus Mandeln (Fluka, Neu Ulm)
- Cellulase aus *Aspergillus niger* (Fluka, Neu Ulm)
- Clara-Diastase (Enzymgemisch: α -Amylase, Cellulase, Invertase, Peptidase, Phosphatase, Sulfatase) (Fluka, Neu Ulm)
- Esterase aus Schweineleber immobilisiert auf Eupergit (Fluka, Neu Ulm)
- Galactomannase aus *Aspergillus niger* (Fluka, Neu Ulm)
- Hesperidinase aus *Aspergillus niger* (Fluka, Neu Ulm)
- immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SPE 235) (Novo Nordisk A/S / Bagsvaerd, Dänemark)
- Lipase aus *Candida antarctica* (Fluka, Neu Ulm)
- Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* (Fluka, Neu Ulm)
- Lipase aus *Rhizopus dalamar* (Serva, Heidelberg)
- Lipase aus *Rhizopus niveus* (Serva, Heidelberg)
- Lipase aus Schweinemagen (Sigma, München)
- Naringinase aus *Penicillium decumbens* (Sigma, München)
- Taka-Diastase aus *Aspergillus oryzae* (Taka-Amylase) (Fluka, Neu Ulm)
- α -Amylase aus *Bacillus subtilis* (Fluka, Neu Ulm)
- α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* (Fluka, Neu Ulm)

2.1.2 Lösungsmittel

alle verwendeten Lösungsmittel besitzen p.a. Qualität

- Cyclohexan (Merck, Darmstadt)
- Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Ethylacetat (Merck, Darmstadt)
- Methanol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
- n-Butanol (Merck, Darmstadt)
- Pentanol (Merck, Darmstadt)
- tert-Butylmethylether (Merck, Darmstadt)
- Wasserstoffperoxid (35%) (Merck, Darmstadt)

2.1.3 Feststoffe

- Ammoniumsulfat (Fluka, Neu Ulm)
- Calciumchlorid (Fluka, Neu Ulm)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Fluka, Neu Ulm)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu Ulm)
- Kaliumpermanganat (Fluka, Neu Ulm)
- Magnesiumsulfat (Fluka, Neu Ulm)
- Natriumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu Ulm)
- Natriumhydroxid (Fluka, Neu Ulm)
- Natriumsulfat (Fluka, Neu Ulm)

2.1.4 Säuren/Katalysatoren

- Amberlyst 15 (Acros, Geel, Belgien)
- Bortrifluorid-Methanol-Reagenz (Fluka, Neu Ulm)
- konzentrierte Schwefelsäure (Fluka, Neu Ulm)
- Phosphorsäure (Fluka, Neu Ulm)
- Salzsäure (37%) (Fluka, Neu Ulm)

2.1.5 Öle

- Rapsöl, erucasäurearm

(Henkel KGaA, Düsseldorf)

Tab. 2: Prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren in Rapsöl

Fettsäure	[Gew. %] laut Herstellerangaben
C16:0	4
C18:0	1
C18:1	60
C18:2	20
C18:3	9
C22:1	2

2.1.6 Standards

- Ölsäuremethylester

(Roth, Karlsruhe)

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Glukose

Die Quantifizierung der freigesetzten Glukose erfolgte mit dem accutrend® Glukose Analyser von Boehringer (Mannheim). Das Testprinzip der Glukosemessung ist die Glukoseoxidase-Mediator-Reaktion, die bei pH=7 durchgeführt wird. Die Messung erfolgt reflektionsphotometrisch. Der Messbereich liegt bei 0–600 mg/dL (=0-6 g/L).

2.2.2 Phosphat

Der Phosphatgehalt wurde semiquantitativ mit einem Stäbchentest (Merckoquant[®] Phosphat-Test (PBM) 10428, Merck, Darmstadt) durch visuellen Vergleich der Reaktionszone mit den Farbfeldern einer Skala ermittelt.

2.2.3 Ammonium

Der Ammoniumgehalt wurde semiquantitativ mit einem Stäbchentest (Merckoquant[®] Ammonium-Test 10024, Merck, Darmstadt) durch visuellen Vergleich der Reaktionszone mit den Farbfeldern einer Skala ermittelt.

2.2.4 Peroxid

Der Peroxidgehalt wurde semiquantitativ mit einem Stäbchentest (Merckoquant[®] Peroxid-test, Merck, Darmstadt) durch visuellen Vergleich der Reaktionszone mit den Farbfeldern einer Skala ermittelt.

2.2.5 Biomasse

10 mL der Kultursuspension wurde mit 10 mL Ethanol/n-Butanol=1/1 (v/v) intensiv durchmischt. Die Biomasse wurde bei 10 000 x g abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und ausgewogen.

2.2.6 Ölsäure

Für die Bestimmung des Ölsäuregehaltes wurde ein Gaschromatograf (Chrom-pack 438 A, Frankfurt), bestückt mit einer Chrompack CP-SIL 50 Säule, verwendet. Als Detektor diente ein FID. Der Extrakt wurde methyliert und mit Ethylacetat auf eine Konzentration von ca. 2 g/L Ölsäuremethylester verdünnt. 1 µL der Lösung wurde injiziert. Es wurde ein Temperaturgradient von 165-220°C gefahren. Als Standard wurde der reine Ölsäuremethylester gelöst in Ethylacetat verwendet.

2.2.7 Rapsöl

3 mL der Kultursuspension wurde zweimal mit gleichem Volumen tert-Butylmethylether extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt. Der Gehalt an Rapsöl wurde durch HPLC auf einer RP-18 Säule (ET 250/3 Nucleosil 120-5 C₁₈ Macherey und Nagel, Düren) bestimmt. Als mobile Phase diente Chloroform/Acetonitril (v/v=30:70). Die Flussrate betrug 0,8 mL/min. Als Detektor diente eine ELSD (evaporative light-scattering detector) - Einheit (Alltech, Mk III, Deerfield).

2.2.8 Sophoroselipide

100 mL der Kultursuspension wurde zwei mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernung des Lösemittels wurde der Rückstand ausgewogen. Der Gehalt an Sophoroselipiden ergibt sich aus der Subtraktion der zuvor ermittelten Werte von Rapsöl und Ölsäure.

2.2.9 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der freien Naringinase wurde die Anfangsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Sophoroselipid-Säure-Konzentrationen (1,7 mM bis 32 mM) bestimmt. Die Enzymkonzentration betrug 1mg/mL. Die Reaktion wurde in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit einem Reaktionsvolumen von 50 mL durchgeführt. Als Lösemittel diente ein 0,1 M Phosphatpuffer (pH=5). Die freigesetzte Glukose wurde mittels eines Glukoseanalysers bestimmt (Kapitel 2.2.1, S.8). Zur Bestimmung der freigesetzten Glukose aus Sophoroselipid-Säure wurde jeweils 0,5 mL der Probe mit 10 µL 1 M Natronlauge neutralisiert.

Im folgenden soll der MICHAELIS-MENTEN-Mechanismus [39] diskutiert werden, der sich mit der Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen $[S]$ bei gegebener anfänglicher Enzymkonzentration $[E_0]$ befasst. Die Enzymreaktion läuft in zwei Teilschritten ab.

Zunächst bildet sich aus Enzym E und Substrat S der Enzym-Substrat-Komplex ES , wobei k_1 bzw. k_{-1} die Geschwindigkeitskonstante für Hin- bzw. Rückreaktion ist. Dann zerfällt der Enzym-Substrat-Komplex in Produkt und zurückgebildetes Enzym, wobei k_2 bzw. k_{-2} die Geschwindigkeitskonstante für Hin- bzw. Rückreaktion ist.



Für die Änderung von $[ES]$ pro Zeiteinheit gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad (1)$$

mit $k_1 \cdot [E] \cdot [S]$ für die Bildung des Komplexes

$-k_{-1} \cdot [ES]$ für die Rückreaktion

$-k_2 \cdot [ES]$ für den Zerfall des Komplexes

Unter der Annahme, dass k_1 , k_{-1} und k_2 von vergleichbarer Größenordnung sind, k_{-2} aber viel kleiner ist, so dass die Rückreaktion nicht berücksichtigt werden muss, kann sich ein quasi-stationärer Zustand einstellen. Die Annahme der Quasi-Stationarität besagt, dass die zeitliche Änderung von $[ES]$ gleich null ist, d.h. dass pro Zeiteinheit eben soviel von $[ES]$ gebildet wird wie zerfällt. Für die Bildungsgeschwindigkeit ergibt sich dann mit $\frac{d[ES]}{dt} = 0$.

Die Enzymkonzentration zur Zeit t ist gegeben durch

$$[E_0] - [ES]$$

wobei $[E_0]$ die Anfangskonzentration des Enzyms ist.

Durch Umformen und Einsetzen ergibt sich:

$$\frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2)$$

Der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten ist definiert als MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_M :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

Durch Auflösen von Gl. 2 nach $[ES]$ lässt sich die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes $[ES]$ im quasi-stationären Zustand als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ ausdrücken:

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

Für die Bildungsgeschwindigkeit v des Produktes P gilt:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (5)$$

Einsetzen von Gl. 4 in Gl. 5 ergibt:

$$v = k_2 \cdot \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Ist die Substratkonzentration $[S]$ viel größer als die MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_M , so wird die Effektivgeschwindigkeit v maximal; die Sättigungsgeschwindigkeit v_{\max} ist erreicht.

Es gilt:

$$v_{\max} = k_2 \cdot [E_0] \quad (7)$$

Einsetzen von Gl. 7 in Gl. 6 führt zur MICHAELIS-MENTEN-Kinetik:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Die MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymatischen Katalyse von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration an (Abb. 2).

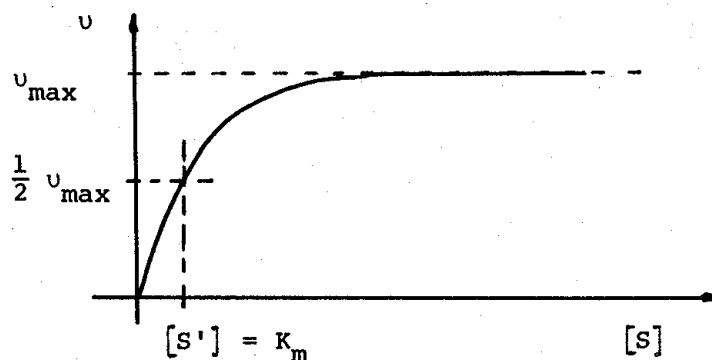


Abb. 2: Schematische Darstellung einer enzymatisch katalysierten Reaktion

Bei der grafischen Auftragung von v gegen $[S]$ ergibt sich eine hyperbole Sättigungskurve. Experimentell wird zum Erhalten der Sättigungskurve zu jeder Substratanfangskonzentration $[S_0]$ die zugehörige Anfangsgeschwindigkeit v_0 bestimmt.

Für kleine Substratkonzentrationen $[S]$ steigt die Anfangsgeschwindigkeit v linear mit $[S]$ an. Für die halbmaximale Geschwindigkeit $\frac{1}{2} v_{\max}$ ist die MICHAELIS-MENTEN-Konstante gleich der Substratkonzentration: $[S] = K_M$.

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter wurden drei verschiedene Linearisierungen herangezogen:

2.2.9.1 Linearisierung nach Lineweaver-Burk

Wird der Kehrwert der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung gebildet, gilt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{v_{\max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{v_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Eine Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ liefert eine Gerade mit

Steigung: K_M / v_{\max}

y-Achsenabschnitt: $1/v_{\max}$

x-Achsenabschnitt: $-1/K_M$

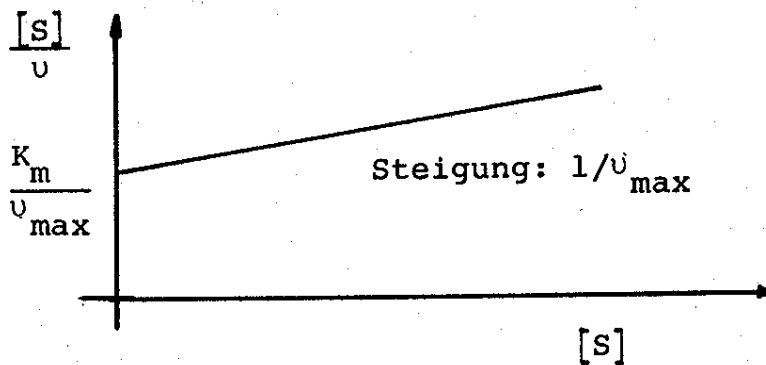


Abb. 3: Linearisierung nach Lineweaver-Burk

2.2.9.2 Linearisierung nach Eadie-Hofstee

Der Kehrwert der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung wird mit $v \cdot v_{\max}$ multipliziert:

$$v_{\max} = K_M \cdot \frac{v}{[S]} + v$$

bzw. durch Umstellen nach v ergibt sich:

$$v = -K_M \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max}$$

Auftragung von v gegen $v/[S]$ liefert eine Gerade mit

Steigung: $-K_M$

y-Achsenabschnitt: v_{\max}

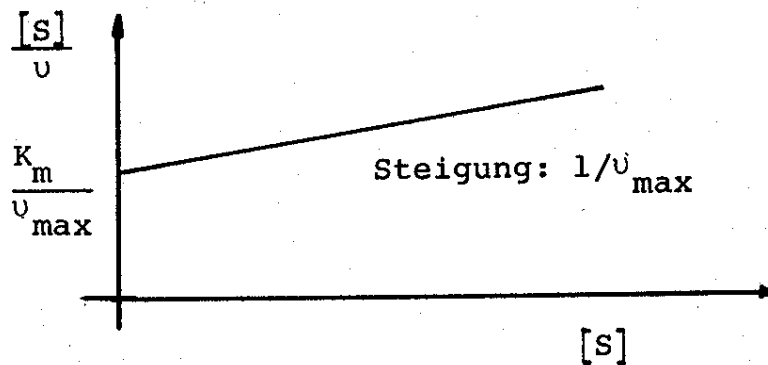


Abb. 4: Linearisierung nach Eadie-Hofstee

2.2.9.3 Linearisierung nach Dixon-Hanes-Woolf

Wird der Kehrwert der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung mit $[S]$ multipliziert, gilt:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S]$$

Bei einer Auftragung von $[S]/v$ gegen $[S]$ ergibt sich eine Gerade mit

Steigung: $1/v_{\max}$

y-Achsenabschnitt: K_M/v_{\max}

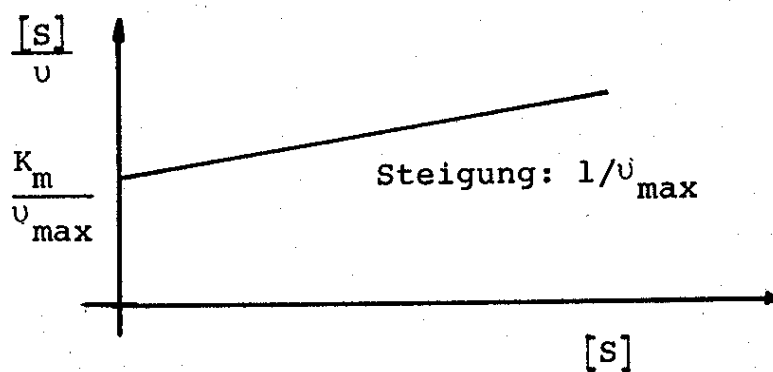


Abb. 5: Linearisierung nach Dixon-Hanes-Woolf

2.3 Chromatografische Methoden

2.3.1 Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatografie (MPLC)

Zur gezielten Isolierung einzelner Komponenten wurde die Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatografie (MPLC) eingesetzt (Abb. 6). Als Trennmedium dienten gepackte Glassäulen. Die Eluenten wurden mit Hilfe einer Kolbenhubpumpe über die Säulen transportiert.

Geräte:

Detektor:	Differential-Refraktometer LCD 201, Fa. Melz, Melz UV-Detektor Gynothek SP-4, Techlab, Erkerode
Datenschreiber:	SE 120, BBC-Goerz/Metrawatt, Nürnberg
Fraktionssammler:	Frac-100, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pumpe:	Techlab, Erkerode

Um ein Bersten der Säulen und eine irreversible Komprimierung des Festbettes zu verhindern, wurde der Säulenvordruck auf 6 bar begrenzt. Probenmenge und Aufgabevolumen richten sich nach Säulengröße (Tab. 3).

Tab. 3: Abhängigkeit von Säulengröße und Probenmenge

Säulengröße (Länge-Durchmesser [mm])	Probenmenge [mg]	Probenvolumen [mL]
310 - 25	1000	1
440 - 37	3000	5
770 - 75	10 000 – 15 000	50

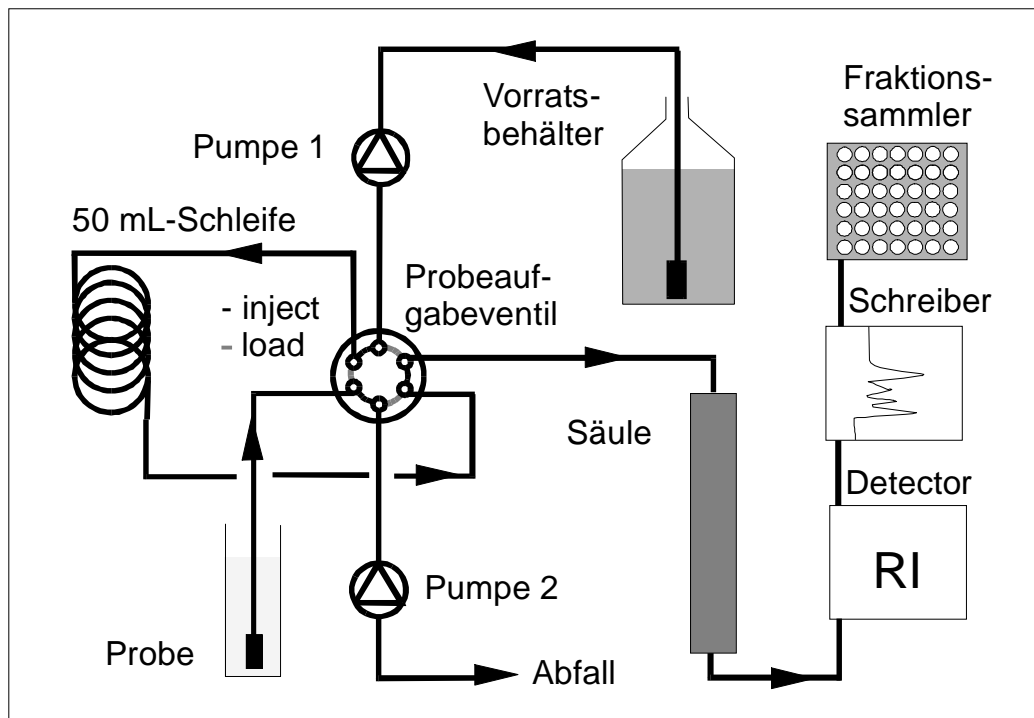


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatografie

Für die Übertragung von analytischer auf präparative Säule gilt [40]:

$$\frac{X_{\text{analytisch}}}{r_{\text{analytisch}}^2} = \frac{X_{\text{präparativ}}}{r_{\text{präparativ}}^2} * \frac{L_{\text{analytisch}}}{L_{\text{präparativ}}}$$

$$\Leftrightarrow X_{\text{präparativ}} = \frac{X_{\text{analytisch}}}{r_{\text{analytisch}}^2} * \frac{L_{\text{präparativ}}}{L_{\text{analytisch}}} * r_{\text{präparativ}}^2$$

mit:

$X_{\text{analytisch}}$: Flussrate der analytischen Säule

$X_{\text{präparativ}}$: Flussrate der präparativen Säule

$L_{\text{präparativ}}$: Länge der präparativen Säule

$L_{\text{analytisch}}$: Länge der analytischen Säule

$r_{\text{analytisch}}$: Radius der analytischen Säule

$r_{\text{präparativ}}$: Radius der präparativen Säule

Die Durchflussrate wird durch den maximalen Flüssigkeitsdruck begrenzt. So konnte bei der großen Säule (770-75) nur ein Fluss von maximal 7 mL pro min angewendet werden.

2.3.2 Dry-Flash-Chromatografie (DFC)

Diese Technik wurde zuerst von Harwood [41] entwickelt. Sie erlaubt eine Trennung von Substanzen mit ähnlichen Rf-Werten. Die Probe adsorbiert an einem Träger und wird anschließend durch ein Lösemittelgemisch unter Vakuum sukzessive eluiert (Abb. 7). Die Zusammensetzung des Gemisches orientiert sich dabei an den Ergebnissen der Dünnschicht-Chromatografie. Substanzen mit einem Rf-Wert $> 0,5$ werden von der Säule desorbiert.

Die Glasfritte wird mit dem Adsorbens gefüllt, so dass ein ausreichender Freiraum für die aufzugebende Lösemittelmenge gewährleistet ist. Es wurde auf eine dichte Packung ohne Kanalbildung geachtet. Das Lösemittel passiert dadurch die Säule in horizontaler Front.

Die aufzugebende Probe wurde zuvor an das Trägermaterial adsorbiert und gleichmässig auf der Oberfläche der Säule verteilt. Zum Schutz des Festbettes wurde dieses mit einem Filterpapier bedeckt.

Auf die Säule wurde das Lösemittelgemisch entsprechend der Fraktionsgröße gegeben (Tab. 4). Durch das Anlegen des Vakuums wurde die Säule getrocknet. Das Reagenzglas wurde mit jeder Fraktion gewechselt.

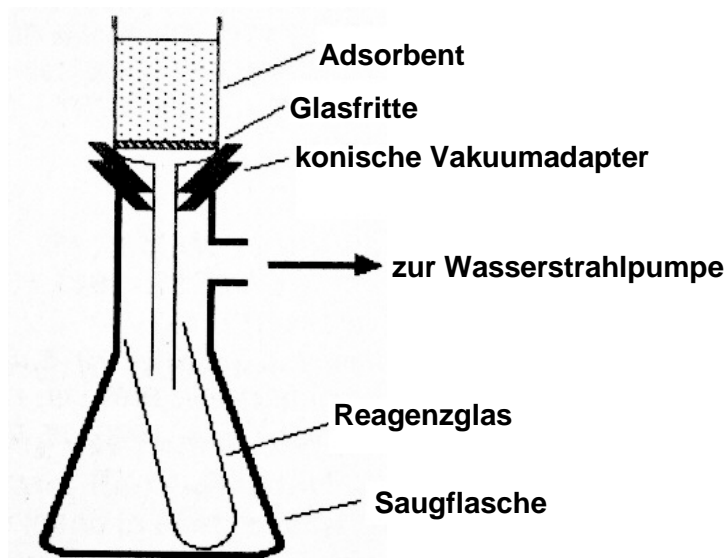


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Dry-Flash-Chromatografie (DFC)

Es wurde jeweils mit einem polaren und einem unpolaren Lösemittel gearbeitet. Bei Verwendung von Kieselgel wurden Ethylacetat und Cyclohexan, bei der RP-18-Phase Methanol und deionisiertes Wasser verwendet. Ausgehend von einer Startzusammensetzung der Lösemittel wurde mit einem Gradient von 1% pro Fraktion gearbeitet. Im Fall des Kieselgels wurde hierzu der Ethylacetatanteil bzw. bei der RP-18-Phase der Methanolanteil erhöht. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde über DC analysiert.

Tab. 4: Daten der Dry-Flash-Chromatografie (DFC)

Glasfritte Durchmes- ser [mm]	Glasfritte Länge [mm]	Menge an Adsorbens [g]	Probenmen- ge [mg]	Fraktions- größe [mL]
30	45	15	15-500	10-15
40	50	30	500-2000	15-30
70	55	100	1000-5000	20-50

2.3.3 stationäre Phasen

- DC Alufolien 20x20 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)
- DC Alufolien 20x20 RP18 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)
- Kieselgel (Merck, Darmstadt)
- RP18 (Merck, Darmstadt)
- Lichrospher(Merck, Darmstadt)

2.3.4 Sprühreagenzien

- Sprühreagenz A: Schwefelsäure/Methanol 1/1 (v/v)
- Sprühreagenz B: 0,5%ige wässrige Kaliumpermanganatlösung
- Sprühreagenz C: Bromkresolgrün (0,05%ige ethanolische Lösung)
(Merck, Darmstadt)
- Sprühreagenz D: α -Naphthol/Schwefelsäure:
10,5 mL α -Naphthollösung (15% in Ethanol),
6,5 mL Schwefelsäure (konz.),
40,5 mL Ethanol und 4 mL Wasser.

Zur optischen Detektion der Substanzen wurden die Dünnschicht-Chromatogramme mit oben angegebenen Reagenzien besprüht. Die Entwicklung erfolgte bei Sprühreagenz A und D nach 1 min bei 150°C. B und C zeigten bei Raumtemperatur die entsprechende Reaktion. Sprühreagenz A wurde als Universalfärbemittel eingesetzt, das organische Verbindungen braun färbt. Rosa bis violette Spots entstehen bei Zucker und zuckerhaltigen Komponenten mit Sprühreagenz D. Ungesättigte Verbindungen führen mit Sprühreagenz B zu gelben Spots auf magentafarbenem Hintergrund. Sprühreagenz C führt zu gelben Spots auf blaugrünem Grund bei Anwesenheit von Säuren.

2.3.5 präparative Säulen

- Lobar[®]-Fertigsäule: Größe C (440-37), LiChroprep[®] RP-18, (40-63 µm)
(Merck, Darmstadt)
- Lobar[®]-Fertigsäule: Größe C (440-37), LiChroprep[®] Si, (40-63 µm)
(Merck, Darmstadt)

2.3.6 Quantitative Dünnschicht-Chromatografie

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte am rechnergesteuerten Densitometer CD 60 (Desaga, Heidelberg). Die Proben wurden bandenförmig in einer Breite von 1cm aufgetragen und über Fläche und Farbintensität ausgewertet. Externe Kalibrierung erfolgte durch mitgeführte Standards.

Messparameter für die densitometrische Analyse:

Messart:	Remission/Extinktion
Messwellenlänge:	450 nm
Spaltbreite:	1,0 mm
Zahl der Messungen pro Punkt :	8
Auflösung bei Datenaufnahme:	0,1 mm
Kalibrierung:	extern nach Peakfläche

2.4 Spektroskopische Methoden

2.4.1 EI-Massenspektroskopie

Elektronen-Ionisations-Spektren wurden mit einem Quadrupol-Massenspektrometer, Modell MAT 4515 der Firma Finnigan/USA aufgenommen.

2.4.2 FAB-Massenspektroskopie

Fast-Atom-Bombardement-Massenspektren der aufgereinigten Substanzen wurden an einem Massenspektrometer der Fa. Finnigan, USA, Modell MAT 8430 aufgenommen. Als Matrix wurde Glycerin eingesetzt. Bei positiver Ionisation wurden die Clusterionen $[M+Na]^+$ der Verbindungen detektiert; negative Ionisation führte zu deprotonierten Molekülanionen $[M-H]^-$.

2.4.3 Gaschromatografie-Massenspektroskopie (GC-MS)

Zur qualitativen Analyse einzelner Substanzgemische wurden diese einer kombinierten gaschromatografischen-massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Dazu wurde ein Kapillargaschromatograf Modell HRGC mega series der Fa. Erba, Hofheim/ts, eingesetzt, der mit einem Quadrupol-Massenspektrometer, Modell MAT 4515 der Fa. Finnigan, USA, gekoppelt war.

Analysebedingungen:

Säule:	ZB1-30 W, Innendurchmesser 0,32 mm
Trärgas:	Helium
Säulenvordruck:	50 kPa
Injektor:	Split-Injektor, Split 1:20
Injektortemperatur:	250°C
Detektion:	MS/Elektronenstoss-Ionisation (EI)
Ofentemperatur:	150°C -> 300°C, 6°C pro min
Probenvolumen:	1 µL

2.4.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

An einem Bruker ARX 400 und PPX 600 Spektrometer wurden ^1H -NMR-Standardspektren und ^1H -breitbandentkoppelte ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Zur näheren Bestimmung der Multiplizität der ^{13}C -Signale wurden DEPT-Spektren angefertigt. Zur genaueren Zuordnung der ^1H -NMR- und der ^{13}C -NMR-Signale wurden für alle Substanzen zweidimensionale (H,H)- und (C,H)-korrelierte

Spektren (COSY) aufgenommen. In allen Fällen wurde deuteriertes Methanol als Lösungsmittel benutzt, als interner Standard diente Tetramethylsilan. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen benutzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett

2.5 Pharmazeutische Tests

Die Untersuchungen wurden gemäss den NCI-Richtlinien [42] mit den Tumorzelllinien HMO2 (Magenkarzinom) und Hep G2 (Leberkarzinom) durchgeführt.

Die Zellen wurden auf 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Als Medium diente RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum. 24 h nach Aussaat wurden die Prüfsubstanzen (Konzentrationen im Ansatz: 0,1; 0,5; 1; 5 und 10 µg/mL) zugegeben und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl (Proteinbestimmung mit Sulforhodamin) bestimmt. Die Prüfsubstanzen wurden in DMSO bzw. Wasser gelöst. Die DMSO-Konzentration im Testansatz betrug 0,1%.

Aus den Konzentrationswirkungskurven wurden folgende Werte bestimmt:

GI50: Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung
 des Zellwachstums bewirkt.

TGI: Konzentration, die eine vollständige Hemmung
 des Zellwachstums bewirkt.

LC50: Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt
 und nach 24 h die initial vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.

2.6 Gewinnung der Sophoroselipide mittels *Candida bombicola*

Die Stammhaltung der *Candida (Toruopsis) bombicola* ATCC 22214 erfolgte auf YM Agarplatten und wurde monatlich übertragen. Hieraus wurden 100 mL Medium als Inokulum beimpft. Als Gefäße dienten 500 mL-Erlenmeyerkolben, die mit sterilen Wattestopfen verschlossen waren. Das Standardmedium zur Batch-Kultivierung enthielt pro L deionisiertes Wasser 100 g Glukose, 100 g raffiniertes Rapsöl (50% v/v C18:1), 4g (NH₄)₂SO₄, 1g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄-H₂O und 5g Maisquellwasser. Die Vorkultur wurde 24 h bei 100 upm und 25°C inkubiert. 50 mL der Kultursuspension wurde bei einem Start-pH-Wert von 4,5 in 500 mL Medium in 2000 mL-Erlenmeyerkolben, die mit sterilen Wattestopfen verschlossen waren, überführt und für 72 h wie oben angegeben kultiviert. Als Inokulum zur Bioreaktorkultivierung wurden 5% (v/v) der Kultursuspension verwendet. Der Start-pH-Wert von 4,5 wurde während der stationären Phase mittels 5 M NaOH auf pH=3,5 eingestellt [43].

Die Batch-Kultivierung kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase beinhaltet die Biomasseproduktion. Die Produktion der Sophoroselipide erfolgt in der zweiten stationären Phase unter stickstofflimitierten Bedingungen mit Triglyceriden oder Fettsäuren als Substrat [44].

2.7 Chemische Methylierung

Zur Darstellung der Methylester wurde 5-7 mg Fettsäure mit 150 µL einer 0,5 N methanolischen NaOH-Lösung versetzt und in einem Wasserbad bei 80°C erwärmt. Nach dem vollständigen Auflösen der Säure wurde die Lösung mit 170 µL Bortrifluorid-Methanol-Reagenz versetzt und weitere 20 h im Wasserbad bei 80°C erhitzt. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels DC mit Sprühreagenz C überprüft.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit etwa 350 μL gesättigter NaCl-Lösung versetzt und mit 700 μL Cyclohexan 1 min lang intensiv durchmischt. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt.

3. Ergebnisse

3.1 Aufarbeitung des Sophoroselipid-Rohextraktes

Ein Ziel der Aufarbeitung war die Vereinheitlichung des Sophoroselipid-Rohextraktes zwecks Generierung eines homogenen Startmaterials, da nativ ein komplexes Produktgemisch vorlag (Abb. 1, S.2). Zusätzlich wurden mittels Dünnschicht-Chromatografie freie Fettsäuren detektiert.

Als Zielsubstanz wurde die Freisetzung der deacytelierten Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1) angestrebt. Dazu galt es, die Acetylreste in Position 6' und 6'' des Zuckergerüsts zu entfernen und den Lactonring zu öffnen. Die Doppelbindung des Fettsäureteils sollte dabei erhalten bleiben.

3.1.1 Alkalische Verseifung

Eine saure Hydrolyse führt insbesondere in protischen Lösemitteln zur Protonierung der Doppelbindung. Die Nebenreaktionen des entstehenden Carbokations beinhalten dann nukleophile Substitutionen, Polymerisationen oder Umlagerungen. Folglich wurde auf eine säurekatalysierte Reaktion verzichtet.

Esterhydrolyse und Veresterung bilden ein Gleichgewicht. Bei der Esterspaltung durch alkalische Hydrolyse werden neben dem Alkohol die wasserlöslichen Natriumsalze der Fettsäuren erhalten. Ein gleichioniger Zusatz von z.B. NaCl bedingt eine Überschreitung des Löslichkeitsproduktes. Die sedimentierenden Fettsäuresalze werden aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt und verschieben somit dieses vollständig in Richtung der Hydrolyse.

Zur alkalischen Verseifung wurden 100 g des lyophilisierten Sophoroselipid-Rohextraktes in 500 mL 5 N wässriger NaOH suspendiert und bei 100°C für 10 Minuten refluxiert.

Nach Abkühlen der Lösung wurden zwei verschiedene Methoden (Abb. 8) der Aufarbeitung gewählt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Konzentration

des Neutralisationsmittels. Bei der Methode **1** wurde 5 N Salzsäure, bei Methode **2** 12 N Salzsäure verwendet.

Der Nachteil von Methode **1** ist das aufgrund der geringen Säurekonzentration entstehende große Flüssigkeitsvolumen beim Ansäuern der Lösung auf pH=4. Ein Vorteil besteht darin, dass dabei entstehendes festes NaCl durch Vakuumfiltration separiert werden kann. Die Essigsäure wurde durch Vakuumdestillation entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wurde zur Entfernung der freien Fettsäuren einer Flüssig/Flüssig-Extraktion mit n-Hexan unterworfen.

In der wässrigen Phase sind neben den Sophoroselipiden auch noch NaCl-Ionen gelöst, welche durch einen Zusatz von Silbernitrat nachgewiesen werden konnten. Zur Entfernung der Ionen wurden zwei Methoden (Abb. 8, **1a** und **1b**) getestet. Bei Methode **1a** wurde die wässrige Lösung gefriergetrocknet und anschließend eine Soxhletextraktion mit MTBE durchgeführt. Nachteil dieser Methode war die schlechte Löslichkeit der Sophoroselipide in Ether, so dass das Lösemittel während der Extraktion wiederholt erneuert werden musste. Außerdem ließen sich noch Chloridionen nachweisen.

Zur Isolierung der Sophoroselipide aus wässriger Lösung wurden verschiedene Alkohole getestet. Inoue et. al [45] extrahierten die Sophoroselipide mit Glycerin, das aber aufgrund seines hohen Siedepunktes nur schwer durch Destillation zu entfernen ist. Butanol schied aufgrund seines hohen Wassergehaltes aus. Octanol und Hexanol wiesen nach Extraktion nur eine geringe Produktkonzentration auf. Heptanol führte zu starker Emulsionsbildung. Die Extraktion mit Pentanol [46] (**1b**) führte dagegen zu einem salzfreien Produkt, die SL wurden nahezu quantitativ aus der wässrigen Lösung isoliert. Durch wiederholtes Waschen mit deionisiertem Wasser konnte das NaCl vollständig entfernt werden.

Bei der Aufarbeitungsmethode **2** wurde zur Freisetzung der verseiften Fettsäuren 12,5 N Salzsäure eingesetzt. Aufgrund der hohen Säurekonzentration und der bei der Neutralisation entstehenden Wärme wurde die Lösung mit einem Eisbad gekühlt. Die Zugabe der Säure erfolgte portionsweise in mL-Aliquoten. Der hohe Anteil an NaCl bei geringem Flüssigkeitsvolumen führte zu einem pastösen Roh-

hydrolysat. Dieses wurde direkt in eine Extraktionshülse gegeben und mittels Cyclohexan extrahiert. Während der Extraktion wurde der gelartige Zustand zerstört. Es wurden eine wässrige Phase mit NaCl und Sophoroselipiden und eine organische Phase mit den freigesetzten Fettsäuren erhalten. Zur Entsalzung der Sophoroselipide wurde Methode **1b** angewandt. Unter Anwendung der Aufarbeitung **2/1b** wurde aus 100 g Rohprodukt 70 g Sophoroselipid-Säure erhalten (SLS-DEAC).

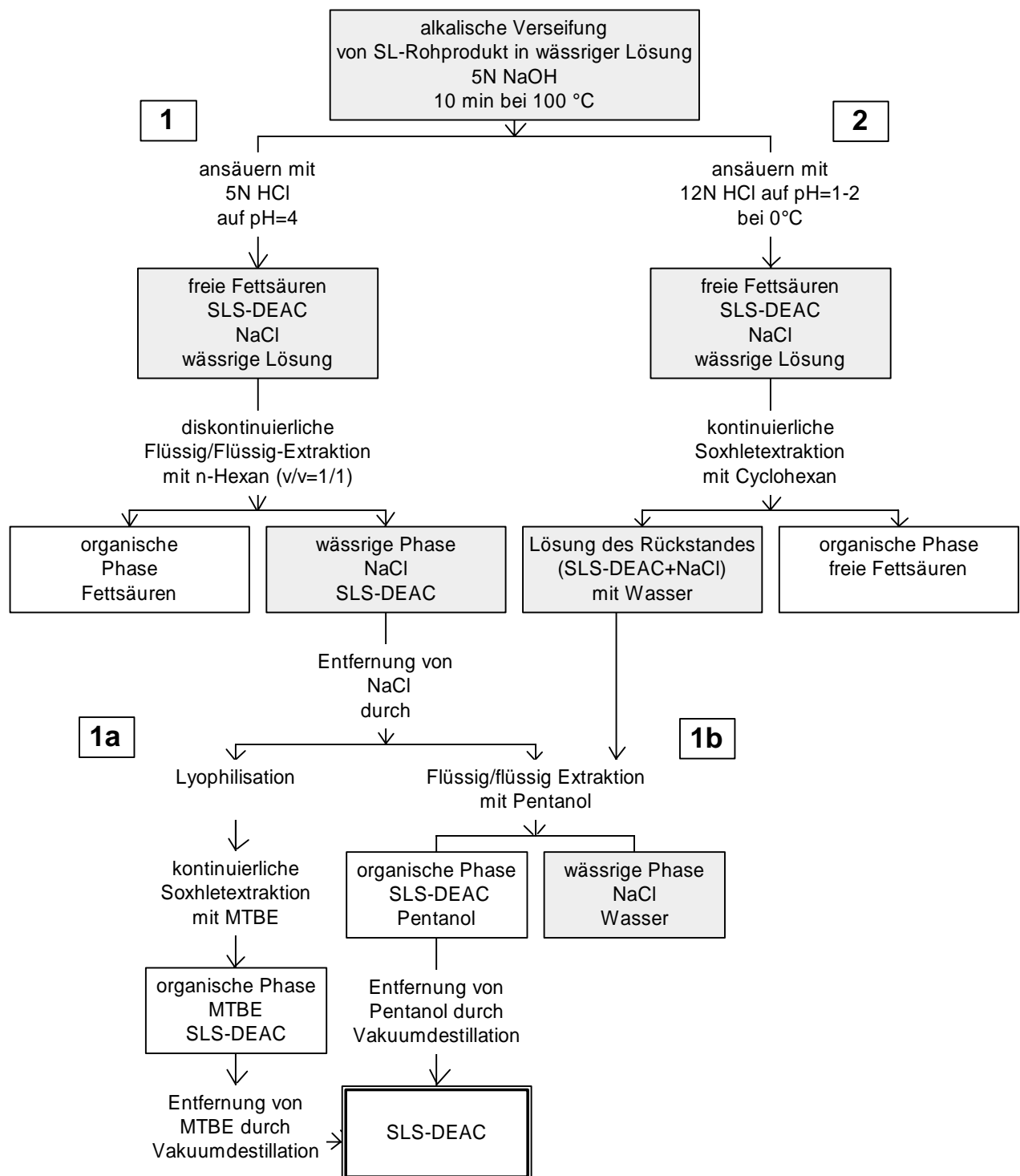


Abb. 8: Aufarbeitung des Sophoroselipid-Rohproduktes nach alkalischer Verseifung

3.1.2 Aufreinigung der Sophoroselipid-Säuren mittels präparativer Mitteldruck-Chromatografie (MPLC)

Nach der alkalischen Hydrolyse wurde die Anzahl der verschiedenen SL auf vier reduziert. Die Verbindungen entsprechen der Formel SLS-DEAC und unterscheiden sich nur in ihrer Fettsäurezusammensetzung (Tab. 5, S. 32).

Zur Isolierung der einzelnen Komponenten wurde die MPLC verwendet, um für nachfolgende Synthesen eine reine Substanz zur Verfügung zu haben.

Zur Trennung wurde eine Lobar[®]-Fertigsäule: Größe C (440-37), LiChroprep[®] RP-18, (40-63 μ m), Fa. Merck, Darmstadt verwendet (Kap. 2.3.1, S.17). Die Reinheitsüberprüfung der einzelnen Fraktionen erfolgte über Dünnschichtchromatografie; RP-18-Alufolien mit Methanol/Wasser=4/1 (v/v) als Laufmittel. Für die einzelnen Fraktionen ergaben sich die in Tab. 5 dargestellten R_f-Werte.

Da zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen noch keine Standards vorlagen, wurden die erhaltenen Fraktionen nur über den Anteil des Trockengewichtes quantifiziert (Tab. 5).

Die Fraktionen > 4% wurden über FAB-MS identifiziert. Das Hauptprodukt bildete mit 56% die offene, deacetylierte Form der Sophoroselipide (SLS-DEAC 18:1; R_f=0,42). Daneben ergab sich eine Mischfraktion aus der ungesättigten (ω -1)-OH-(C18:1)-Säure und der gesättigten (ω -1)-OH-(C18:0)-Säure (R_f=0,33) des Sophoroselipids. Die zweifach ungesättigte (ω -1)-OH-(C18:2)-Säure (R_f=0,48) des offenen, deacetylierten Sophoroselipids (R_f-Wert=0,48) wurde in zwei Mischfraktionen detektiert. Die Lactonform des Sophoroselipids (SLL-DEAC 18:1; R_f=0,79) wurde bei der alkalischen Hydrolyse nahezu vollständig umgesetzt (Anteil<1%).

Tab. 5: Aufreinigung der nach alkalischer Verseifung mittels MPLC erhaltenen Sophoroselipide: Rf-Werte (DC:RP18; Laufmittel:Methanol/Wasser(v/v)=4:1) und prozentuale Zusammensetzung der gewonnenen Fraktionen:

Substanzen ¹	Rf-Wert	Anteil [%] wiederge- funden	Anteil [%] gemessen ¹
SLS-DEAC (C18:1)	0,42	56	71
SLS-DEAC (C18:2)	0,48		17
SLS-DEAC (C18:1)+SLS-DEAC (C18:2)	0,42+0,48	26	
SLS-DEAC (C18:1)+SLS-DEAC (C18:0)	0,42+0,33	9	
SLS-DEAC (C18:0)	0,33	4	4
SLS-DEAC (C18:1)+SLS-DEAC (C18:2) + ? ²	0,42+0,48+0,66	2	
? ²	0,66	1	
SLL-DEAC (C18:1)	0,79	<1	

¹ Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen erfolgte über GC-MS und FAB-MS. SLS: offene Form der Sophoroselipide; SLL: Lactonform der Sophoroselipide; DEAC: deacetyliert; C18:1: die erste Zahl beschreibt die Anzahl der C-Atome und die zweite Zahl die Anzahl der Doppelbindungen der gebundenen Fettsäure

² nicht identifizierte Substanz

3.1.3 Überprüfung der Reinheit der SLS-DEAC 18:1 mittels FAB-MS

Im negativen FAB-Spektrum treten im Bereich der hohen Massen die Molekülionen-Peaks der deprotonierten Verbindung $[M-H]^-$ mit grösster Intensität auf. Die Fraktion mit SLS-DEAC 18:1 ($R_f=0,42$) weist mit $[M-H]^- = 621$ eine Reinheit von über 90% auf (Abb. 9). Geringe Verunreinigungen sind mit $[M-H]^- = 619$ auf die offene, deacetylierte (ω -1)-OH-(C18:2)-Säure der Sophoroselipide zurückzuführen. Für stereochemische Untersuchungen wurde die SLS-DEAC 18:1 durch einen zweiten MPLC-Lauf aufgereinigt. Als Substrat diente die hochreine Sophoroselipid-Säure, die sowohl auf der RP-DC als auch auf der chiralen DC (Kapitel 3.9, S.76, Abb. 41) nur einen Spot aufwies.

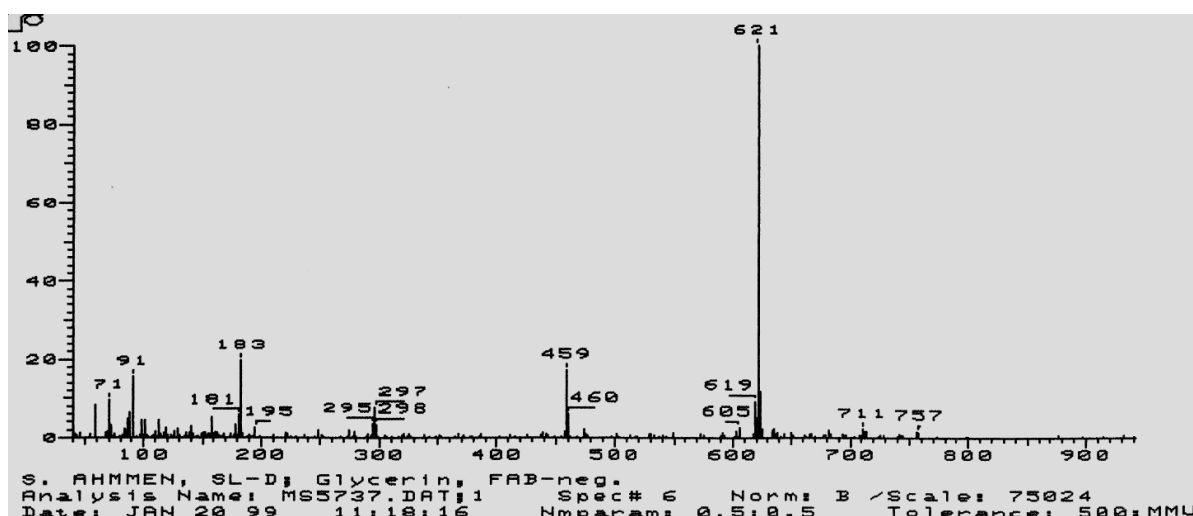


Abb. 9: FAB-neg. Massenspektrum der SLS-DEAC 18:1 in Glycerin

3.2 Chemisches Screening

3.2.1 Vorversuche mit anorganischen Säuren

Die Vorversuche zur Umsetzung der SLS-DEAC wurden mit unterschiedlichen Salz- und Schwefelsäurekonzentrationen in verschiedenen unpolaren Lösemitteln wie Hexan, Cyclohexan, MTBE und Dioxan durchgeführt (Abb. 10). Die Temperatur betrug 60°C. Nach einer Stunde wurden die Reaktionslösungen abgekühlt und zur Neutralisation mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Die Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatografie detektiert.

Im Vordergrund der Untersuchungen standen zum einen die regiospezifische Freisetzung der Hydroxyfettsäure und zum anderen die Generierung von neuartigen Substanzen mit interessanten Eigenschaften. Hierzu zählten neben optischer Aktivität auch die sensorischen Eindrücke, die in Tab. 6 wiedergegeben sind.

Die Umsetzung von SLS-DEAC in Dioxan mit 2 N HCl lieferte einen bräunlich gefärbten Spot bei $R_f=0,06$, der als (ω -1)-OH-Fettsäure identifiziert wurde. Aufgrund der hohen Reinheit wurde diese Hydrolyse zur Synthese der (ω -1)-OH-Fettsäure im g-Maßstab verwendet (siehe Kap. 3.5.1, S. 53).

Geruchsaktive Substanzen wurden bei Verwendung von Schwefelsäure in Hexan, Cyclohexan und MTBE erhalten. Die Konzentration der Säuren hatte keinen Einfluss auf den sensorischen Eindruck, welcher als süßlich, moschusartig bzgl. Cyclohexan und Hexan beschreibbar (Tab. 6) ist. Einen deutlich herberen Geruchseindruck liefert der Einsatz von MTBE als Lösemittel.

In den organischen Phasen sind in Abb. 10 die für Kohlenhydrate charakteristischen magentafarbenen Banden bei einem R_f -Wert von 0,65 zu erkennen. Hellgelbe Spots bei einem R_f -Wert von 0,32 sowie braun gefärbte Spots unterhalb von $R_f=0,34$ und auf der Basislinie weisen auf Ester- bzw. Fettsäureverbindungen hin.

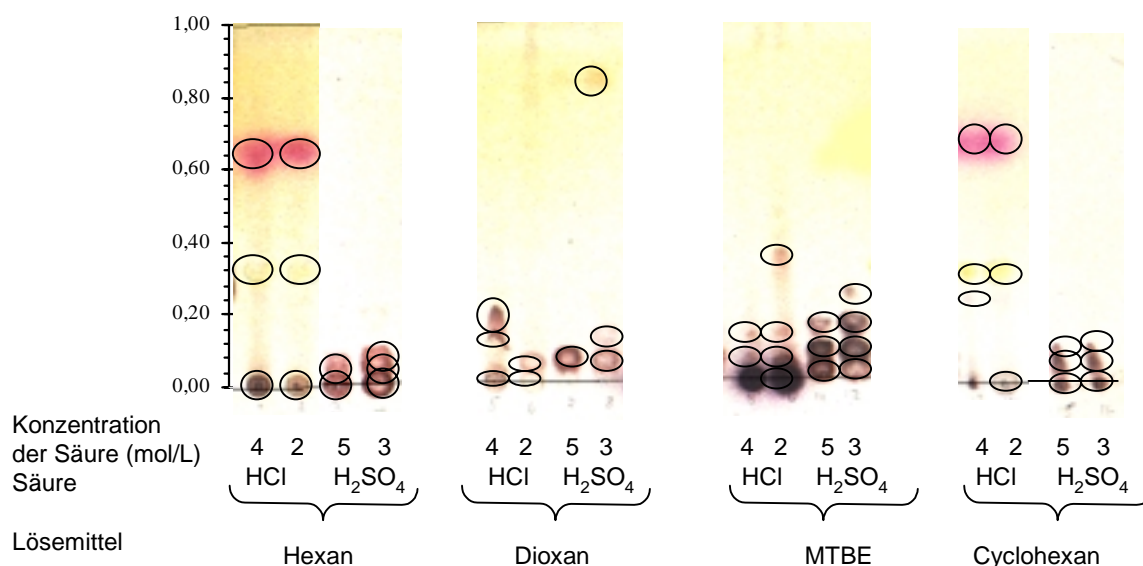


Abb. 10: Chemische Hydrolyse der SLS-DEAC in unpolaren Lösemitteln mit Salzsäure (HCl) und Schwefelsäure (H₂SO₄). DC RP 18 mit Laufmittel Methanol/Wasser=4:1(v/v); Färbemittel: α -Naphthol

Tab. 6: Sensorische Beurteilung der durch chemische Hydrolyse erhaltenen Produkte der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1):

[C] Säure	Lösemittel	Geruchseindruck
4 N H ₂ SO ₄	Hexan	süßlich, moschus
2 N H ₂ SO ₄	Hexan	süßlich, moschus
5 N HCl	Hexan	-
3 N HCl	Hexan	-
4 N H ₂ SO ₄	Dioxan	-
2 N H ₂ SO ₄	Dioxan	-
5 N HCl	Dioxan	-
3 N HCl	Dioxan	-
4 N H ₂ SO ₄	MTBE	herb, erdig, moschus
2 N H ₂ SO ₄	MTBE	herb, erdig, moschus
5 N HCl	MTBE	-
3 N HCl	MTBE	-
4 N H ₂ SO ₄	Cyclohexan	süßlich, moschus
2 N H ₂ SO ₄	Cyclohexan	süßlich, moschus
5 N HCl	Cyclohexan	-
3 N HCl	Cyclohexan	-

Die geruchsaktiven Substanzen wurden nachfolgend untersucht. Dazu wurden 5 g SLS-DEAC in 500 mL MTBE suspendiert und mit 50 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde in einem Wasserbad bei 80°C 2 h lang refluxiert. Nach dem Abkühlen des Gemisches wurde die Lösung durch Zugabe von NaOH neutralisiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde nach Filtration des Gemisches unter Vakuum entfernt.

Die Aufreinigung erfolgte über DFC. Es wurde eine Glasfritte D3 mit einem Durchmesser von 70 mm und einer Länge von 65 mm verwendet. Die Fraktionsgröße betrug 50 mL. Die Reinheitsüberprüfung erfolgte über DC (Abb. 11). Die erhaltenen Fraktionen wurden sensorisch beurteilt und entsprechend ihrer geruchlichen Eigenschaften gruppiert (Tab. 7). Zur Quantifizierung wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt und die zusammengefassten Fraktionen ausgewogen (Abb. 12).

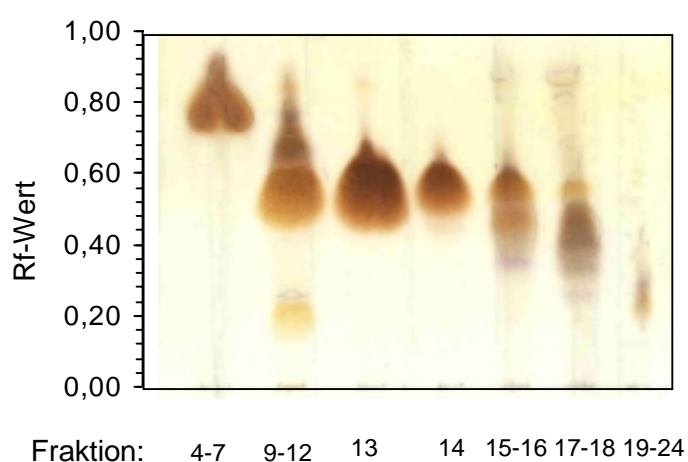


Abb. 11: Chromatogramm (Kieselgel Si 60; Laufmittel: EA:CH=1:2; Sprühreagenz D) zusammengefasster Fraktionen nach Trennung des Gemisches aus der H_2SO_4 -Hydrolyse mittels DFC.

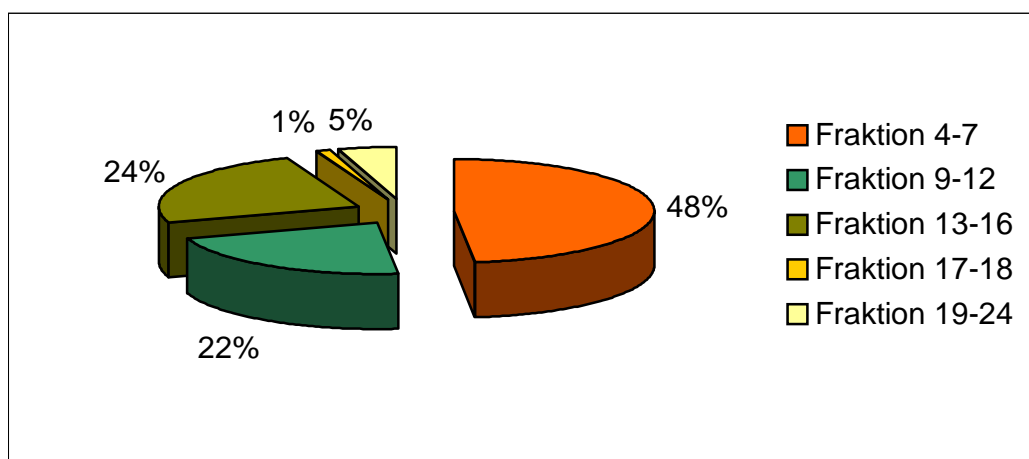


Abb. 12: Prozentuale Zusammensetzung (Gew. %) der zusammengefassten Fraktionen nach Trennung des Substanzgemisches mittels DFC.

Tab. 7: Sensorische Beurteilung der Fraktionen

Fraktion Nr.	Geruchseindruck
4-7	süßlich, moschusartig
9-12	herb, moschusartig
13	schwach nach Rosinen
14	unangenehm stechend
15-16	stark nach Rosinen
17-18	nach Rosinen und Rum
19-24	säuerlich, fettig

Von der Fraktion mit dem höchsten Massenanteil (F4-7) wurde ein GC-MS angefertigt. Über die Gaschromatografie wurde die Anzahl der verschiedenen Komponenten ermittelt. Den chromatografisch aufgetrennten Substanzen wurden die entsprechenden Massenspektren zugeordnet. Die Retentionszeiten und die Massenspektren dienten als Referenz und wurden nachfolgend mit denen der Verbindungen aus den enzymatischen Umsetzungen verglichen .

Die höchste registrierte Masse aus Fraktion F4-7, in Abb. 13 als Legende dargestellt, ist nicht notwendig der Molekülpeak. Manche Substanzen wie z.B. viele Alkohole haben keinen oder nur einen sehr schwachen Molekülpeak. Es ist daher zu prüfen, ob die Ionen der nächst niedrigen Masse durch sinnvolle Abspaltung aus dem vermuteten Molekülpeak hervorgegangen sein können. Alkohole zeigen zwar keinen Molekülpeak, dafür aber Ionen, die durch Abspaltung von CH_3 (M-15) oder H_2O (M-18) entstehen. Da Stickstoff das einzige Atom mit ungerader Bindigkeit und gerader Massenzahl ist gilt folgende „Stickstoffregel“: Sind die meisten Fragmentpeaks geradzahlig, ist die Molekülmasse ungeradzahlig (und umgekehrt). Eine ungerade Massenzahl deutet auf eine ungerade Zahl von N-Atomen hin. Da bei den untersuchten Verbindung kein Stickstoff enthalten ist, sind die höchsten registrierten Massen $M=311$ und $M=327$ auf Fragmentationen zurückzu-

führen. Substanzen mit identischer höchster Massenzahl und Spektrum weisen bei unterschiedlicher Retentionszeit auf Isomere der Verbindungen hin.

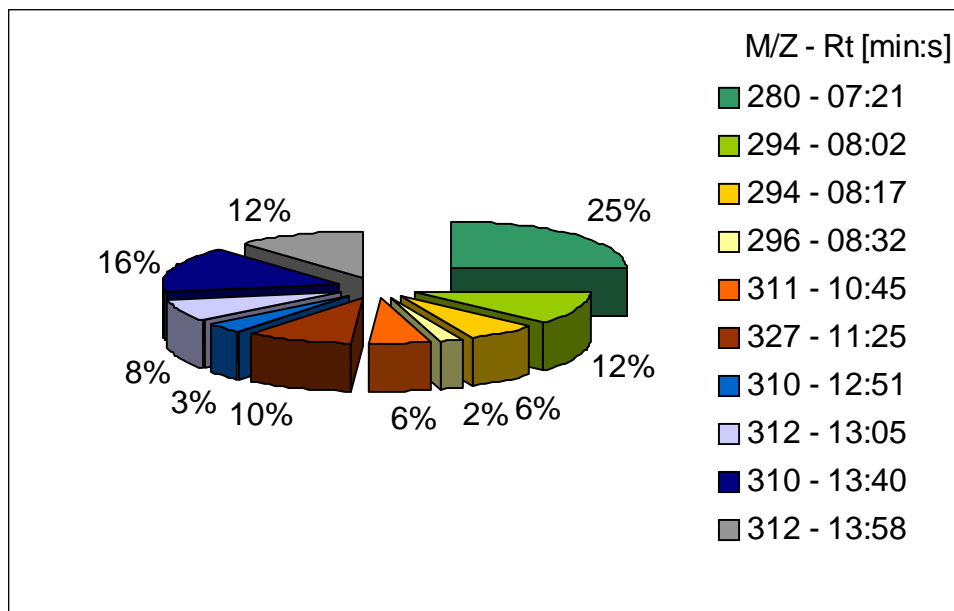


Abb. 13: Prozentuale Zusammensetzung (Gew. %) der Fraktion F4-7. Zuordnung über Retentionszeit (Rt) und Peak höchster Masse (M/Z). Die Untersuchung erfolgte mittels GC-MS.

3.3 Optimierung der Glukoselipid-Säure-Herstellung

Zur Produktion der Glukoselipid-Säure nach Rau et al. 1999 [47] wurde bei einem pH-Wert von 9 und einer Temperatur von 40°C insgesamt eine Zeit von 30 h benötigt. Die Reaktionsdauer konnte um 90% reduziert werden, wenn ein 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5 verwendet wurde. Die Glukoselipid-Säure wurde hierbei als Intermediat innerhalb weniger Stunden gebildet. Die Abspaltung einer weiteren Glukoseeinheit führte zur Entstehung der (ω -1)-OH-Fettsäure. Die Freisetzung der Glukosemoleküle aus der Sophoroselipid-Säure ist sowohl als Folge- als auch Parallelreaktion denkbar. Dazu wurden weitere Untersuchungen durchgeführt (Kapitel 3.3.1., S.39)

3.3.1 Temperatureinfluss

Im folgenden wurde der Reaktionsverlauf der enzymatischen Sophoroselipid-Säure-Hydrolyse mittels 100 mg Naringinase aus *Penicillium decumbens* bei A=0°C, B=20°C und C=37°C (Abb. 14) untersucht. Als Lösemittel dienten je 50 mL 0,1 M Phosphatpuffer (pH=5) in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben. Die Substratkonzentration betrug 5 g/L. Die Detektion der Edukte und Produkte erfolgte simultan mittels DC aus der wässrigen Lösung. Das Auftragsvolumen betrug 10 µL. Geringfügige Schwankungen der R_f-Werte sind größtenteils auf Wechselwirkung der einzelnen Substanzen untereinander zurückzuführen.

Bei allen untersuchten Temperaturen war eine kontinuierliche Zunahme der Glukose (Glu), auf der DC in Höhe der Laufmittelfront, zu beobachten.

Die Hydrolysegeschwindigkeit der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) nahm mit steigender Temperatur zu. Die Umsetzung war bei 0°C nach 7d, bei 20°C nach 263 min und bei 37°C nach 235 min nahezu vollständig.

Mit abnehmender SLS-DEAC-Konzentration war ein Anstieg der Glukoselipid-Säure-Konzentration (Glu-LS) zu beobachten. Während die (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) bei 37°C schon nach 57 min freigesetzt wurde, ist bei 20°C nach 263 min keine FS neben Glu-LS und SLS-DEAC mehr detektierbar. Bei 0°C wurde nach 7 d neben dem Glu-LS und der SLS-DEAC auch FS detektiert.

Zur Produktion der Glukoselipid-Säure ist folglich eine Reaktionstemperatur von 20°C zu bevorzugen, da hier SLS-DEAC nach 263 min fast vollständig in Glu-LS umgesetzt worden ist. Das entstandene Glu-LS ist dann durch Extraktion mit Pentanol gemäß Abb. 15 aus der wässrigen Pufferlösung isolierbar.

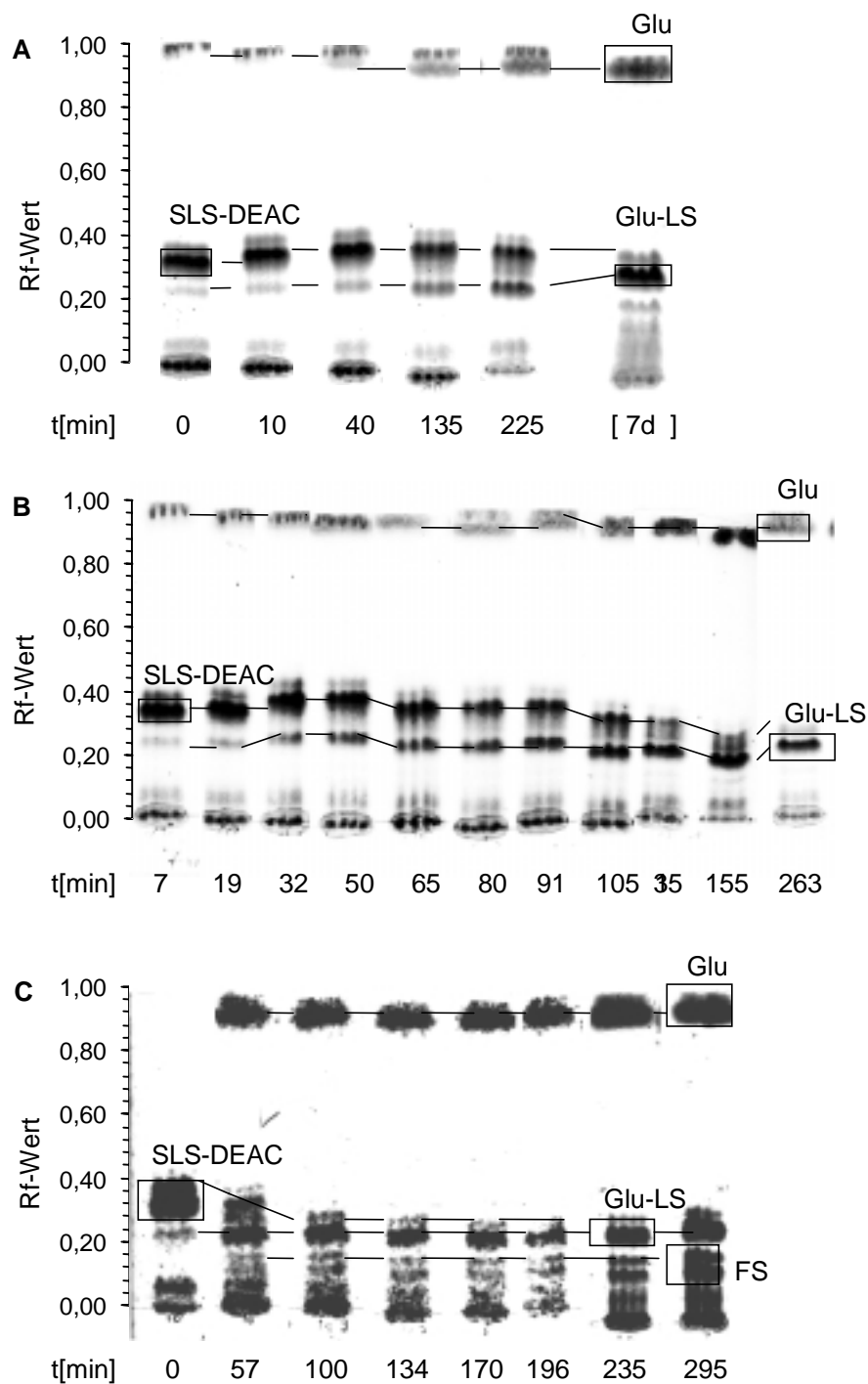


Abb. 14: DC-RP 18 des zeitlichen Verlaufs der SLS-DEAC-Hydrolyse mittels Naringinase aus *Penicillium decumbens* bei A: 0°C ; B: 20°C und C: 37°C. SLS-DEAC: Sophoroselipid-Säure; Glu: Glukose; Glu-LS: Glukoselipid-Säure und FS: Fettsäure.

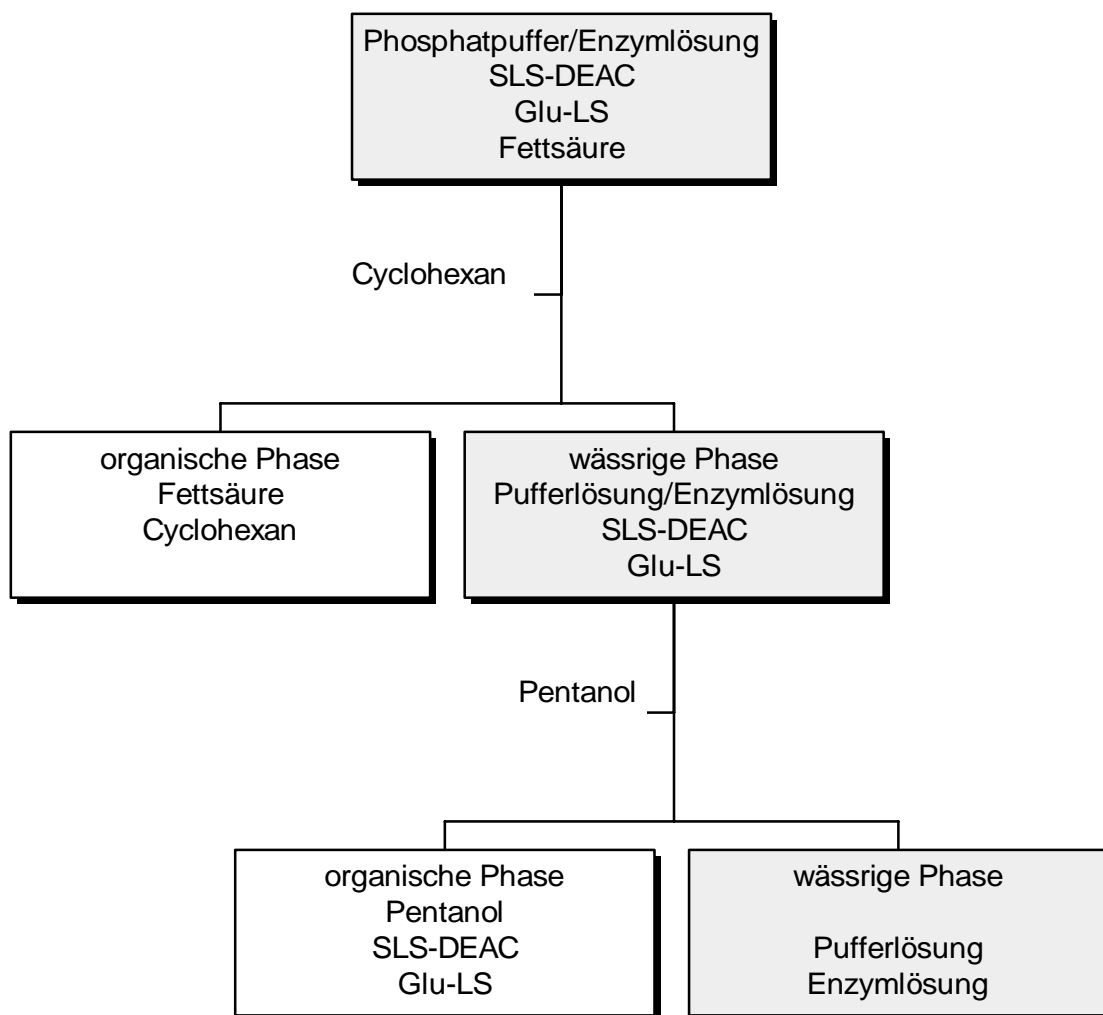


Abb. 15: Schematische Darstellung der Aufarbeitung nach der Sophorolipid-Säure-Hydrolyse. SLS-DEAC: deacetylierte Sophorolipid-Säure; Glu-LS: Glucoselipid-Säure

3.3.2 Einfluss der Substratkonzentration

Abb. 15 und Abb. 16 lassen erkennen, dass die Anfangsgeschwindigkeit in einem Konzentrationsbereich von 4,8-32 mmol/L von der Substratkonzentration nahezu unabhängig ist. Eine Substrathemmung wurde nicht beobachtet. Selbst bei einer Konzentration von 32 mmol/L ist nach 25 h noch eine geringe Steigerung der Glukosekonzentration beobachtbar.

Versuche mit einer SLS-DEAC-Konzentration >32 mmol/L wurden nicht durchgeführt, da weitere Zugaben von Sophoroselipid-Säure zu einer Überschreitung des Löslichkeitsproduktes führten.

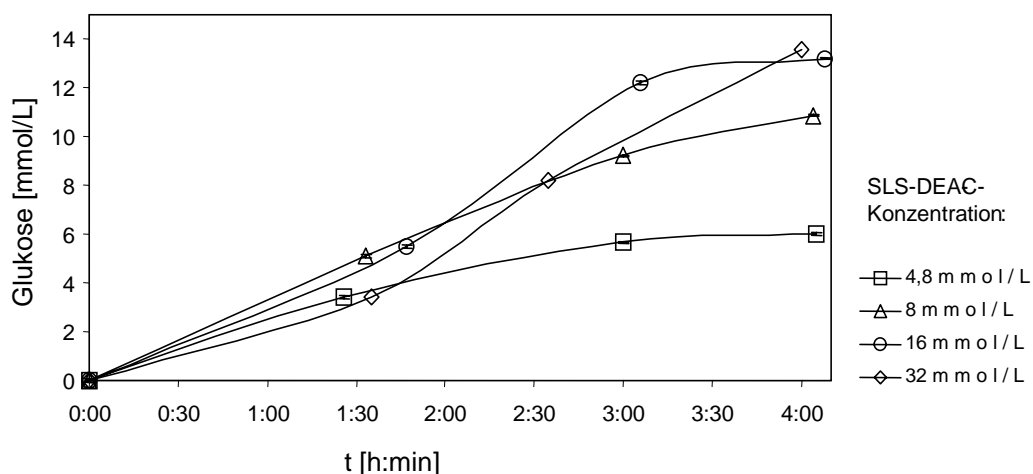


Abb. 16: Einfluß der Substratkonzentration auf die SLS-DEAC-Säure-Hydrolyse bei gleicher Enzymmenge (Anfangsgeschwindigkeit)

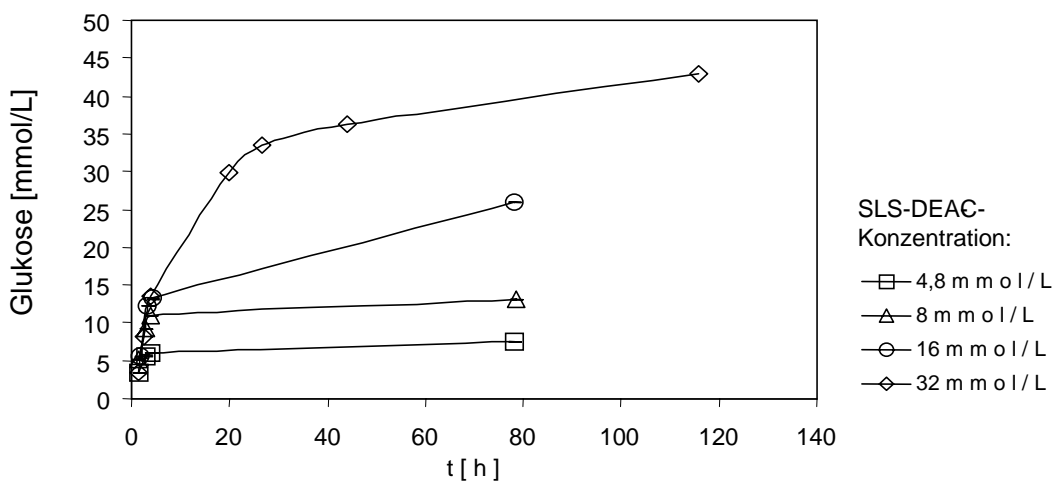


Abb. 17: Einfluß der Substratkonzentration auf die SLS-DEAC-Säure-Hydrolyse bei gleicher Enzymmenge

3.3.3 Kinetik

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten v_{\max} und K_M nach der Michaelis-Menten-Kinetik wurden unterschiedliche Methoden verwendet: Bei der grafischen Auftragung von Umsetzungsgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration $[S]$ soll sich theoretisch eine hyperbole Sättigungskurve ergeben. Experimentell wurde daher zu allen Substratausgangskonzentrationen $[S_0]$ die zugehörige Anfangsgeschwindigkeit v_0 (Mol freigesetzte Glukose pro L und s) bestimmt.

Die Abb. 18 zeigt für geringe Substratkonzentrationen $[S]$ einen nahezu linearen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei höheren $[S]$ einem Grenzwert v_{\max} entgegenstrebt. Für die halbmaximale Geschwindigkeit $2,75 \cdot 10^{-6} / 2 = 1,37 \cdot 10^{-6}$ mol/L*s ist die Michaelis-Menten-Konstante gleich der Substratkonzentration: $[S] = K_M = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Der theoretische Verlauf berechnet sich aus v_{\max} und K_M ist als Vergleich angegeben.

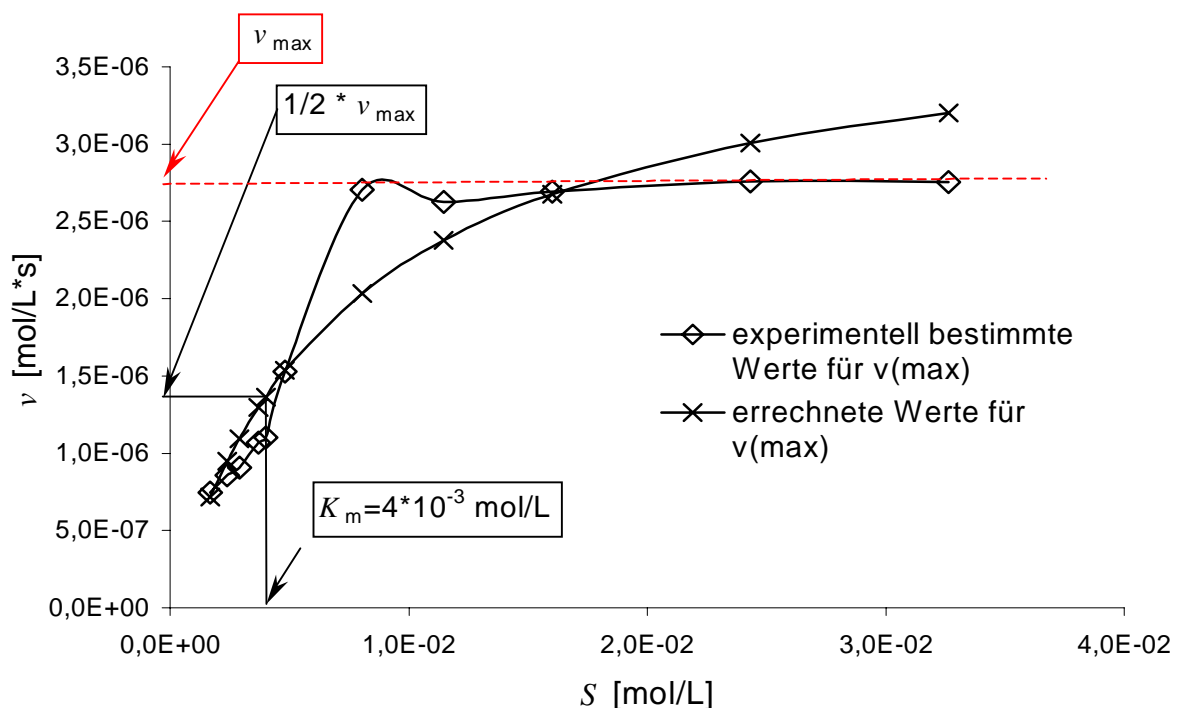


Abb. 18: Michaelis-Menten-Kinetik der Glukoselipid-Säurebildung mit Naringinase aus *Penicillium decumbens* bei 37°C.

Für eine weitere Auswertung wurden in Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21 drei verschiedene Linearisierungen herangezogen (Kapitel 2.2.9, S. 10).

A) Linearisierung nach LINEWEAVER-BURK

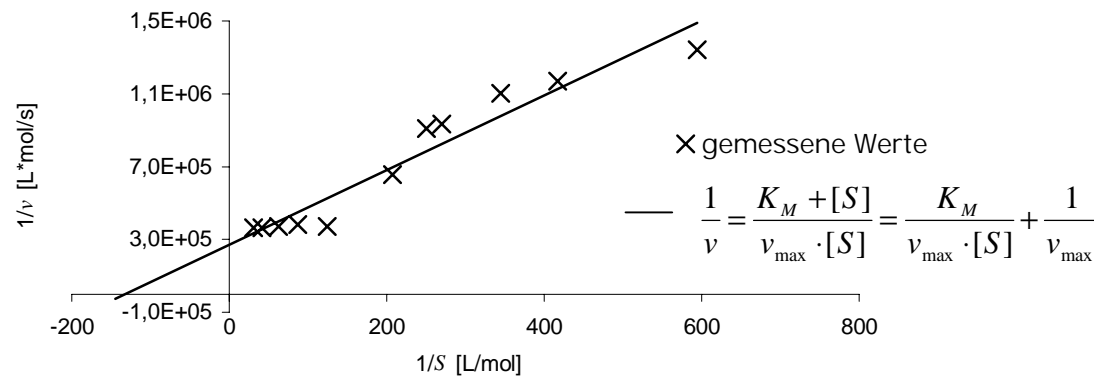


Abb. 19: Grafische Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Lineweaver-Burk

B) Linearisierung nach EADIE-HOFSTEE

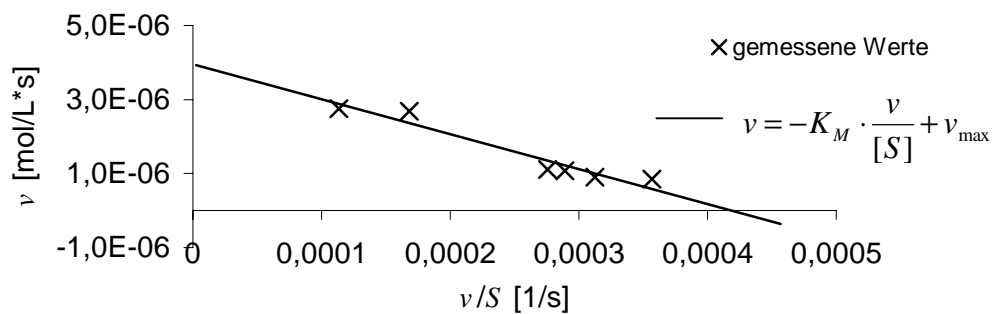
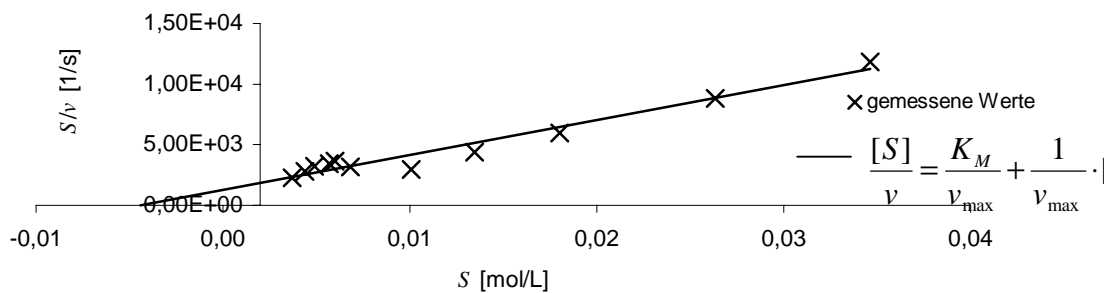


Abb. 20: Grafische Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Eadie-Hofstee

C) Linearisierung nach DIXON-HANES-WOOLF

**Abb. 21:** Grafische Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Dixon-Hanes-Woolf

Aus den vorgestellten Linearisierungen der Michaelis-Menten-Kinetik wurden die in Abb. 22 dargestellten K_M und v_{\max} bestimmt.

Abb. 22: Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) und der Michaelis-Menten-Konstante der Glukoselipid-Säurebildung mit Naringinase aus *Penicillium decumbens* bei 37°C.

Methode	$v_{\max} \cdot 10^{-6} \text{ [mol/L} \cdot \text{s]}$	$K_M \cdot 10^{-3} \text{ [mol/L]}$
Hyperbole Darst.	2,75	4,0
Lineweaver-Burk	3,69	7,5
Eadie-Hofstee	3,94	9,4
Hanes-Woolf	3,48	6,4

Aufgrund der Ungenauigkeit der Bestimmung werden die Werte aus der hyperbolischen Darstellung nicht berücksichtigt, so dass sich für die Reaktionsgeschwindigkeit ein Mittelwert von $v_{\max} = 3.94 \cdot 10^{-6}$ mol/L*s und für die Michaelis-Konstante ein Mittelwert von $K_M = 6.98 \cdot 10^{-3}$ mol/L ergeben. Bei der Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante wurde der Wert aus der Eadie Hofstee-Linearisierung aufgrund seiner hohen Abweichung gegenüber den anderen ebenfalls nicht mit berücksichtigt.

3.4 Enzymatische Hydrolyse der SLS-DEAC 18:1

3.4.1 Vorversuche mit verschiedenen Hydrolasen

Für einen Einsatz der (ω -1)-OH-Fettsäure im pharmazeutischen Bereich ist eine hohe Enantiomerenreinheit anzustreben, da die verschiedenen Enantiomere zu unterschiedlichen Wirkungen führen können. Durch den Einsatz von Biokatalysatoren wurde versucht, die Stereospezifität der Reaktion gegenüber der chemischen Hydrolyse der SLS-DEAC 18:1 zu erhöhen. Es wurden zu diesem Zweck verschiedene kommerziell erwerbbare Hydrolasen wie Lipasen, Glukohydrolasen und Enzymgemische zur Hydrolyse der SLS-DEAC-Säure getestet. Als weitere Reaktionsvariablen dienten pH-Wert und Temperatur. Hierzu wurde in 1,5 mL Eppendorfschen Reaktionsgefäßen jeweils 1 mL 0,1 N wässrige Phosphatpufferlösung des entsprechenden pH-Wertes mit 5-7 mg des Enzyms versetzt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die SLS-DEAC-Konzentration betrug 3 g/L. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte qualitativ und quantitativ mittels Dünnschicht-Chromatografie. Für die Untersuchungen in Kap. 3.4.2 und 3.4.3 wurden nur die in den folgenden Vorversuchen positiv getesteten Enzyme verwendet.

Tab. 8: Umsetzung der SLS-DEAC-Säure mit verschiedenen Enzymen zur Gewinnung der (ω -1)-OH-Fettsäure

Enzym	pH-Wert	Umsetzung
Clara Diastase	5	+
α -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i>	5	-
α -Amylase aus <i>Bacillus subtilis</i>	5	-
Taka Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	5	-
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	5	+
Blindprobe ohne Enzym	5	-
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	5	-
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>	5	+
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	5	+
β -Glukosidase aus Mandeln	5	+
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	7	+
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	7	+
α -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i>	7	-
α -Amylase aus <i>Bacillus subtilis</i>	7	-
Blindprobe ohne Enzym	7	-
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	7	+
β -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i> Typ HP-2	7	+

+: Bildung der (ω -1)-OH-Fettsäure über DC detektiert

-: keine Umsetzung

3.4.2 Umsetzung der SLS-DEAC 18:1 mittels verschiedener β -Glukosidasen

Abb. 23 und Abb. 24 zeigen den Einfluss der Temperatur bei verschiedenen pH-Werten auf die SLS-DEAC-Hydrolyse. Die enzymatischen Umsetzungen erfolgten mit Ausnahme von Naringinase nicht über 60%. Einheitliche Tendenzen der Enzyme für erhöhte Ausbeuten bei pH=5 bzw. pH=7 waren nicht zu beobachten.

Bei pH=5 besaßen die Enzyme: β -Glukosidase aus Mandeln, Galactomannase aus *Aspergillus niger* und Naringinase aus *Penicillium decumbens* ihr Optimum bei T=20°C. Clara Diastase und Hesperidinase aus *Aspergillus niger* zeigten die höchsten Umsätze bei 37°C.

Die Naringinase besitzt bei pH=5 ein Temperaturoptimum von T=20°C mit einem Umsatz von 83%, welcher bei pH=7 und T=4°C auf 89% noch gesteigert werden konnte. Auffällig war auch die geringe Umsetzung von 43% (pH=5) und 26% (pH=7) der SLS-DEAC-Säure bei 37°C (Abb. 23, Abb. 24).

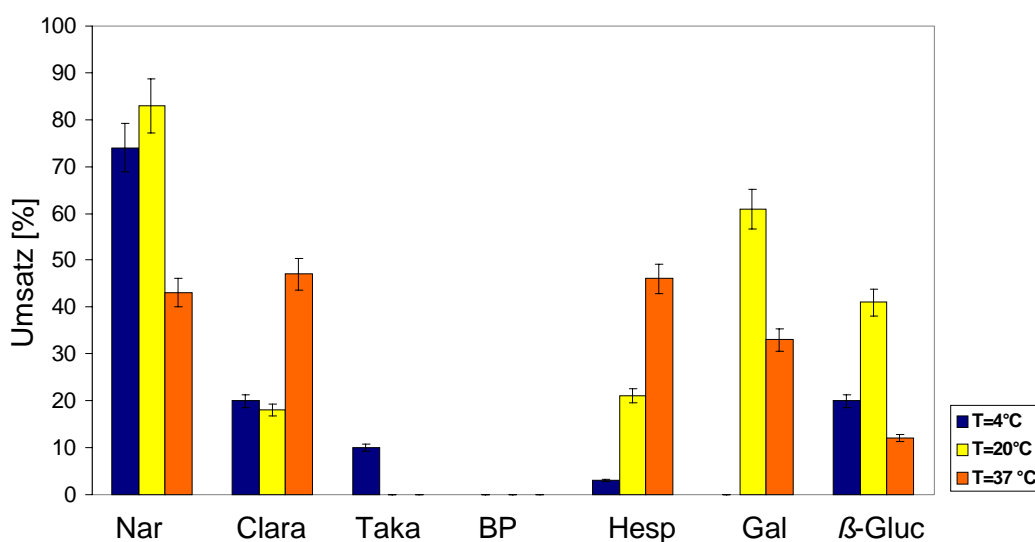


Abb. 23: Quantifizierung der freigesetzten (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 bei pH=5. Nar: Naringinase aus *Penicillium decumbens*; Clara: Clara Diastase; Taka: Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae*; BP: Blindprobe ohne Enzym, Hesp: Hesperidinase aus *Aspergillus niger*, Gal: Galactomannase aus *Aspergillus niger*, β -Gluc: β -Glukosidase aus Mandeln

In neutraler Lösung waren andere Optima zu beobachten: so setzte lediglich Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae* die SLS-DEAC-Säure bevorzugt bei 20°C um. Das Umsatzmaximum von Naringinase aus *Penicillium decumbens* und β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2 lag bei 4°C, das der Cellulase aus

Aspergillus niger, Hesperidinase aus *Aspergillus niger* und β -Glukosidase aus Mandeln bei 37°C.

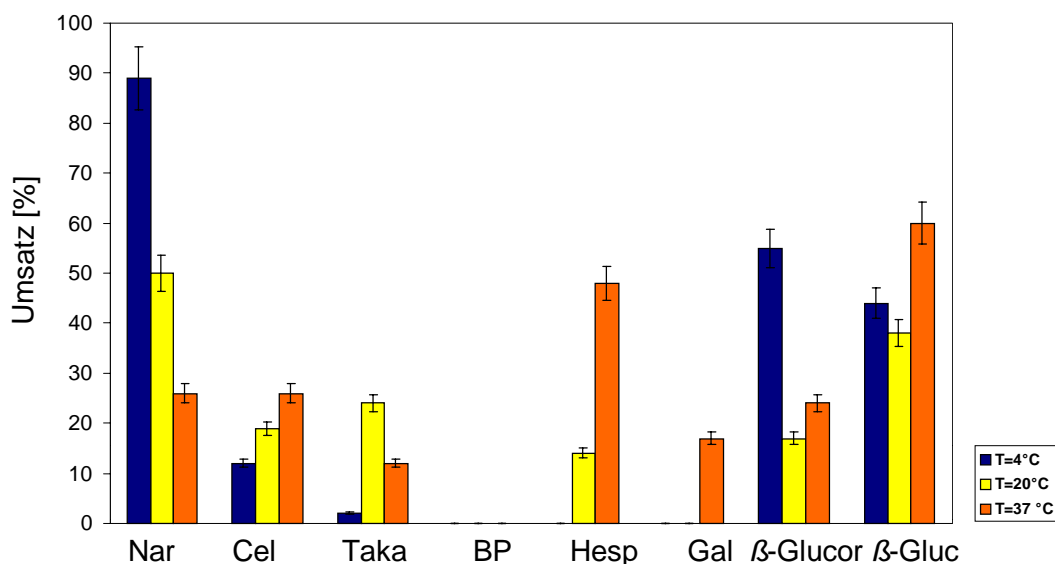


Abb. 24: Quantifizierung der freigesetzten (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 bei pH=7. Nar: Naringinase aus *Penicillium decumbens*, Cel: Cellulase aus *Aspergillus niger*, Taka: Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae*, BP: Blindprobe ohne Enzym, Hesp: Hesperidinase aus *Aspergillus niger*, Gal: Galactomannase aus *Aspergillus niger*, β -Glucor: β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2, β -Gluc: β -Glukosidase aus Mandeln

3.4.3 Bestimmung der Stereochemie der Reaktion

Für die Trennung von Enantiomergemischen ist eine weitere chirale Verbindung notwendig, die mit den Enantiomeren in Wechselwirkung tritt. Die daraus resultierenden Diastereomere sind dann aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften chromatografisch unterscheidbar. Als stationäre Phase wurde eine chirale Dünnschicht-Chromatografieplatte, Lichrospher (Kapitel 3.9, S. 76) von Merck verwendet. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die (ω -1)-OH-Fettsäure direkt ohne weitere Derivatisierung vermessen werden kann. Als externer Standard zur Quantifizierung diente die im g-Maßstab gewonnene aufgereinigte (ω -1)-OH-Fettsäure (Kap. 3.5.2.2, S. 58).

Der Enantiomerenüberschuss (Abb. 25 und Abb. 26) wurde gemäß folgender Formel ermittelt:

$$ee = \frac{A - B}{A + B} \text{ mit } A = \text{FS-1 (Rf=0,35)} \text{ und } B = \text{FS-2 (Rf=0,28)}$$

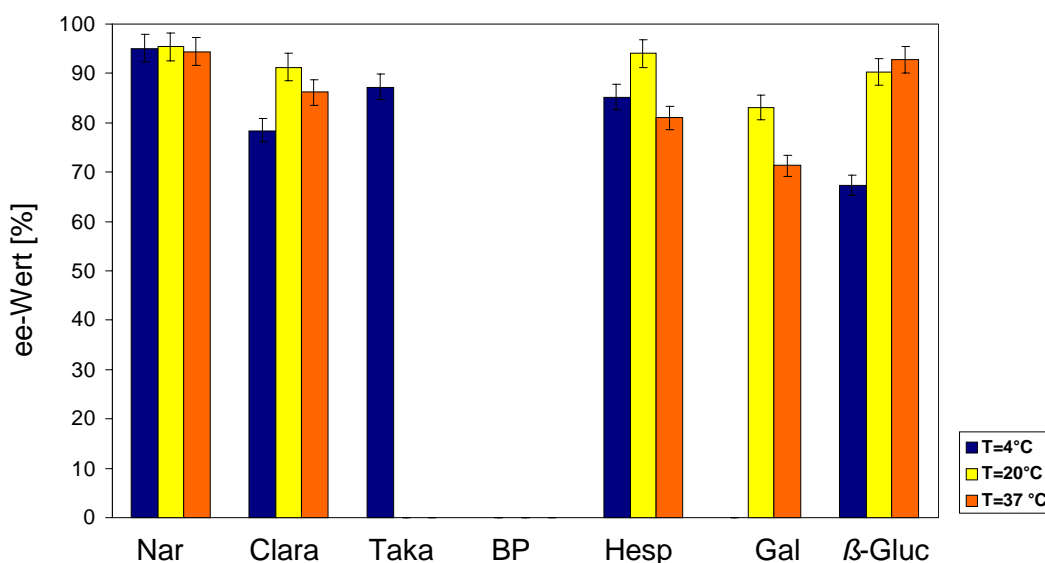


Abb. 25: ee-Werte der freigesetzten (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 aus der enzymatischen Hydrolyse der SLS-DEAC bei pH=5. Nar: Naringinase aus *Penicillium decumbens*; Clara: Clara Diastase; Taka: Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae*, BP: Blindprobe ohne Enzym, Hesp: Hesperidinase aus *Aspergillus niger*; Gal: Galactomannase aus *Aspergillus niger*; β -Gluc: β -Glukosidase aus Mandeln

Die Freisetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure erfolgte mit der Naringinase bei pH=5, unabhängig von der Temperatur, sehr spezifisch mit einem ee-Wert von rund 95%. Dieses war bei pH=7 nur bei 37°C zu beobachten. Mit abnehmender Temperatur von 20°C auf 4°C nahm die Spezifität der Umsetzung von 87% auf 76% ab (Abb. 25, Abb. 26).

Deutliche Temperatureffekte waren bei der β -Glukosidase aus Mandeln erkennbar: Der ee-Wert stieg von 67% (pH=5; T=4°C) auf 90% (pH=5; T=20°C) bzw. 93% (pH=5; T=37°C). Werte von 95% Enantiomerenüberschuss wurden bei pH=7

allerdings nur bei 37°C erzielt. Bei tieferen Temperaturen lagen die Werte mit nur 59% (T=20°C) und 42% (T=4°C) deutlich darunter ((Abb. 25, Abb. 26).

Ähnlich schlechte ee-Werte lieferte die Cellulase aus *Aspergillus niger* bei 4°C und pH=7 mit 59%. Bei höheren Temperaturen von 20°C bzw 37°C wurde dagegen eine erhebliche Steigerung der Spezifität der Reaktion mit ee-Werten von 94% bzw 95% beobachtet (Abb. 25, Abb. 26).

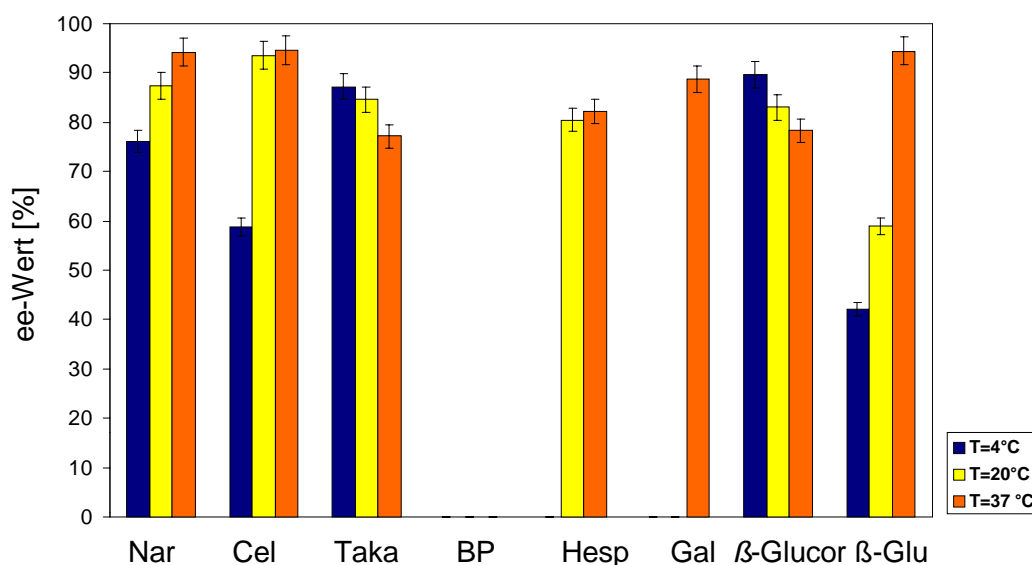


Abb. 26: ee-Werte der freigesetzten (ω -1)-OH-Fettsäure aus der enzymatischen Hydrolyse der SLS-DEAC bei pH=7. Nar: Naringinase aus *Penicillium decumbens*, Cel: Cellulase aus *Aspergillus niger*, Taka: Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae*, BP: Blindprobe ohne Enzym, Hesp: Hesperidinase aus *Aspergillus niger*, Gal: Galactomannase aus *Aspergillus niger*, β-Glucor: β-Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2, β-Glu: β-Glukosidase aus Mandeln

Die Spezifität der Reaktion korrelierte bei den Enzymen Naringinase aus *Penicillium decumbens* (pH=5/7), Cellulase aus *Aspergillus niger* (pH=7), Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2 (pH=7) und β-Glukosidase aus Mandeln (pH=7) mit deren Umsatzmaximum. Die ee-Werte variierten zwischen 90–95% (Abb. 25, Abb. 26). Folglich besaß die generierte (ω -1)-OH-Fettsäure eine sehr hohe Enantiomerenreinheit.

3.4.4 Isolierung der (ω -1)-OH-Fettsäure

In der Tab. 9 ist die Neigung der Reaktionslösung zur Emulsionsbildung nach Zugabe von Cyclohexan (Extraktionsmittel der FS; Aufarbeitungsschema s. Abb. 15, S.41) wiedergegeben.

Tab. 9: Emulsionsbildung bei der Extraktion der (ω -1)-OH-Fettsäure mit Cyclohexan aus der wässrigen Pufferlösung

Enzym	pH-Wert	T=4°C	T=20°C	T=37°C
Clara Diastase	5			----
Taka Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	5		Gel	Gel
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	5			
Blindprobe ohne Enzym	5			
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>	5			----
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	5	----		E-
β -Glukosidase aus Mandeln	5		Eo	Eo
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	7		E-	E-
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	7	E+		E-
Taka Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	7	E-	E+/Z	E+/Z
Blindprobe ohne Enzym	7	E+/P	E+/P	E+/P
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>	7	E+/V	E+/V	E+/V
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	7	----	----	
β -Glucuronidase aus Helix pomatia Typ HP-2	7	E+/P	E+/P	E+/P

E- geringe, **Eo** mittlere, **E+** starke Tendenz zur Emulsionsbildung; **P**: Brechen der Emulsion durch Zugabe von Phosphorsäure; **V**: Brechen der Emulsion durch Erhöhung des Volumenanteils von Cyclohexan; **Z**: Emulsion entmischt sich nach 4h, --- keine Reaktion

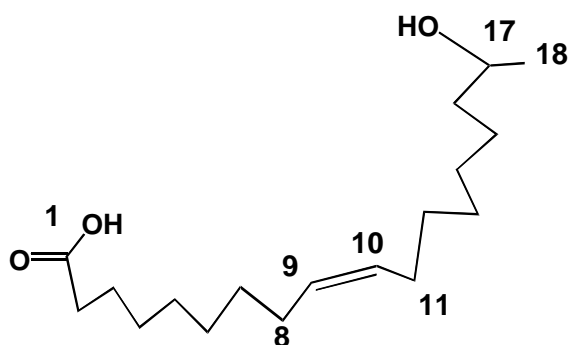
Auffällig ist, dass bei pH=7 eine stärkere Emulsionsbildung auftritt als bei pH=5. Bei den Blindproben konnte die Emulsion durch Zugabe von Phosphorsäure gebrochen werden. Bei Taka Diastase entmischte sich die Emulsion nach längerer Zeit ohne weitere Hilfsmittel. Die emulgierte Reaktionslösung von Hesperidina- se ließ sich durch weitere Zugabe von Cyclohexan auflösen. Wurde die Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure bei einem pH-Wert von 5 und einer Temperatur von 20 bzw 37°C mittels Taka Diastase durchgeführt, so wurde eine gelartige Lösung erhalten, die nicht durch die oben angegebenen Maßnahmen verändert werden konnte.

3.5 Gewinnung der (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 im g-Maßstab

3.5.1 Chemische Hydrolyse der SLS- DEAC 18:1 mit 2N HCl in Dioxan

Die Umsetzung der SLS-DEAC 18:1 mit anorganischen Säuren wies bei Verwendung von Sprühreagenz D auf der DC einen braunen Spot mit einem R_f-Wert von 0,08 auf (Kapitel 3.2.1 Abb. 10). Die Färbung deutete auf eine zuckerfreie Verbindung hin, bei der es sich möglicherweise um eine Fettsäure handelte. Zur Untersuchung dieser Substanz wurde ein Ansatz im g-Maßstab durchgeführt. Dazu wurden die Versuchsbedingungen mit der größten Spezifität bezüglich der zu untersuchenden Komponente ausgewählt.

1g der aufgereinigten SLS-DEAC 18:1 wurde bei 60°C in Dioxan mit 2N HCl 60 min lang refluxiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels MPLC auf einer RP-18-Säule. Als mobile Phase dienten Methanol/Wasser in einem Verhältnis von 80:20. Das Produkt wurde als 17-Hydroxy-cis-9-octadecensäure durch NMR Spektroskopie und FAB-Massenspektroskopie identifiziert (Abb. 27).



^1H NMR (CD_3OD) δ =5.39 [m, H-9, H-10], 3.75 [tq, H-17, J(17-16) 6.2, J(17-18) 6.2], 2.32 [t, H-2, J(2-3) 7.4], 2.07 [m, H-8, H-11], 1.64 [m, H-3], 1.51-1.37 [m, H-4 bis H-7, H-12 bis H-16], 1.20 [d, H-18].

^{13}C NMR (CD_3OD) δ =178.2 (s, C-1), 130.9, 130.8 (2 x d, C-9, C-10), 68.6 (d, C-17), 40.1 (t, C-16), 35.2 (t, C-2), 30.7, 30.7, 30.7, 30.3, 30.2, 30.2, 3.1 (7 x t, C-4 bis C-7, C-12 bis C-14), 28.1, 28.1 (2 x t, C-8, C-11), 26.8 (t, C-15), 26.1 (t, C-3), 23.5 (q, C-18).

(-)-FAB MS: 297 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Abb. 27: Molekularstruktur der (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 (17-Hydroxy-cis-9-octadecensäure)

Die Ausbeute betrug nach chromatografischer Aufreinigung 30%. Die optische Reinheit wurde mittels chiraler DC untersucht und betrug 28,5% (Kap. 3.9., S. 76).

3.5.2 Enzymatische Hydrolyse der SLS-DEAC 18:1

3.5.2.1 Einfluß der Sulfataseaktivität verschiedener Glucuronidasen aus *Helix pomatia* auf die Freisetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1

Die β -Glucuronidase zählt zu den Hydrolasen. Sie spaltet bei einem pH-Wert von 4,4 β -Glucuronide, d.h. Glukoside, die sich von der Glucuronsäure ableiten. Im Handel sind verschiedene Glucuronidasen erhältlich. Diese unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Gehalt an Sulfatase. Im folgenden wurde der Einfluss der Sulfataseaktivität auf die Freisetzung von Glukose aus SLS-DEAC untersucht.

In Tab. 10 sind die verschiedenen eingesetzten Typen der β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* und ihre unterschiedlichen β -Glucuronidase- und Sulfataseaktivitäten (S.A.) aufgeführt.

Tab. 10: Enzymatische Aktivitäten der β -Glucuronidasen aus *Helix pomatia*

Nr.	Enzym	β -Glucuronidase-Aktivität [U/mL]**	Sulfataseaktivität (S.A.) [%]*
1	β -Glucuronidase Typ H-3	119000	<1
2	β -Glucuronidase Typ HP-2	121900	5
3	β -Glucuronidase Typ H-2	132500	7.5

* bezogen auf die vom Hersteller angegebene Gesamtaktivität

** 1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 μ g Phenolphthalein pro Stunde bei pH=5 und 37°C freisetzt (Substrat: Phenolphthaleinglucuronid)

Für die Versuchsdurchführung wurde eine Enzymmenge von 119000 U eingesetzt (Tab. 11). Das Volumen der zugesetzten Enzymlösung errechnet sich aus der vom Hersteller angegebenen β -Glucuronidase-Aktivität (Tab. 10). Vor Enzymzugabe wurden jeweils 0,124 g (200 μ mol) SLS-DEAC in 25 mL 0,1 N Phosphatpuffer gelöst. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C. Der Reaktionsverlauf wurde qualitativ über Dünnschicht-Chromatografie (Abb. 28) und quantitativ über die Messung der Glukosekonzentration (Abb. 29) verfolgt. Die Probenahme erfolgte nach 90, 180 (3 h), 270 (4 ½ h), 1350 (22 ½ h) und 1710 (28 ½ h) Minuten.

Tab. 11: Bildung der (ω -1)-OH-Fettsäure mit β -Glucuronidasen aus *Helix pomatia* bei 37°C. Die eingesetzte Enzymmenge entspricht einer konstanten Enzymaktivität von 119000 U.

Nr.	Enzym	Enzymmenge [μ L]	Substrat	Substratmenge [g]	Reaktionsvolumen [mL]
1	β -Glucuronidase Typ H-3	25	SLS-DEAC	0.1238	25
2	β -Glucuronidase Typ HP-2	24.5	SLS-DEAC	0.1255	25
3	β -Glucuronidase Typ H-2	21.95	SLS-DEAC	0.1245	25

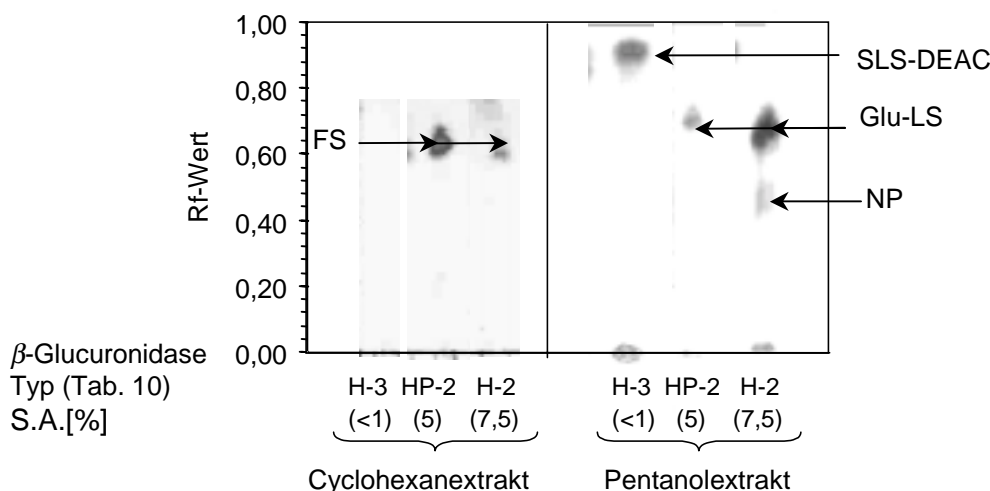


Abb. 28: Qualitative Analyse der Umsetzung von Sophoroselipid-Säure mit verschiedenen β -Glucuronidasen nach 24 h. DC-RP-18 mit Laufmittel: Methanol/Wasser=9/1(v/v); Sprühreagenz D; FS: (ω -1)-OH-Fettsäure; SLS-DEAC: Sophoroselipid-Säure; Glu-LS: Glukoselipid-Säure; NP: Nebenprodukt; S.A.: Sulfataseaktivität

Die Untersuchung der Produkte über Dünnschicht-Chromatografie konnte nicht direkt aus der wässrigen Pufferlösung bestimmt werden. Bei den eingesetzten Enzympräparationen handelte es sich um Rohlösungen, deren Inhaltsstoffe zur starken Schweifbildung und Überlagerung mit den Produkten auf der DC führten. Die Entwicklung einer geeigneten Aufarbeitung der Probelösung zur qualitativen Analytik zeigt Abb. 15.

Zur Untersuchung des Reaktionsverlaufes wurde 1 mL der Probe mit 500 μ L Cyclohexan sorgfältig vermischt und anschließend die abgetrennte wässrige Phase mit 500 μ L Pentanol extrahiert. 50 μ L der so erhaltenen organischen Phase wurde auf eine RP-18-DC-Platte aufgetragen.

Aus Abb. 29 ist deutlich zu erkennen, dass durch die Glucuronidase vom Typ-H3 (S.A.<1%) Glukose nicht aus der SLS-DEAC freigesetzt wurde. Dies korrelierte auch mit den Ergebnissen aus Abb. 28: es wurden weder Fettsäure im Cyclohexanextrakt noch Glukoselipid-Säure (Glu-LS) im Pentanolextrakt detektiert. Das

Chromatogramm des Pentanolextraktes zeigt den Spot der SLS-DEAC bei einem R_f -Wert von 0,92.

Die Glucuronidase vom Typ HP-2 (S.A.=5%) und die Glucuronidase vom Typ H-2 (S.A.=7,5%) setzten nach 24 h (1440 min) insgesamt 0,020 bzw. 0,018 mol Glukose frei. Dabei ergaben sich unterschiedliche Produktspektren, wie aus Abb. 28 hervorgeht. Glucuronidase von Typ H-2 (S.A.=7,5%) wies im Pentanolextrakt neben einem intensiven Spot bei $R_F=0,64$ der Glukoselipid-Säure (Glu-LS) noch ein weiteres Nebenprodukt (NP) mit $R_F=0,44$ auf. Dementsprechend war die Fettsäure (FS) mit $R_F=0,65$ im Cyclohexanextrakt nur schwach zu erkennen.

Der Cyclohexanextrakt der mittels Glucuronidase von Typ HP-2 (S.A.=5%) umgesetzten SLS-DEAC enthielt dagegen eine hohe Konzentration an Fettsäure (Abb. 28, links). Hier wurde die Sophoroselipid-Säure vollständig umgesetzt. Lediglich kleine Mengen an Glukoselipid-Säure wurden noch im Pentanolextrakt nachgewiesen (Abb. 28, rechts).

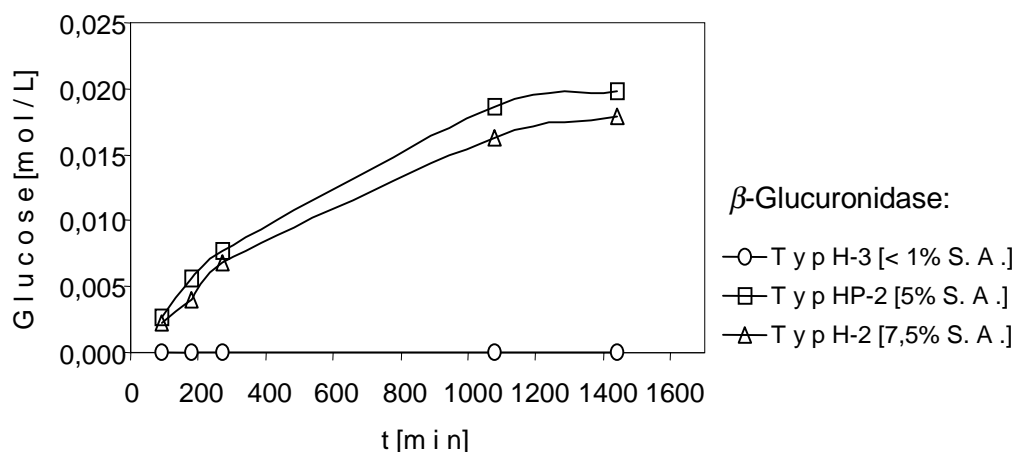


Abb. 29: Einfluss der Sulfataseaktivität (S.A.) der verschiedenen β -Glucuronidasen auf die Freisetzung von Glukose aus Sophoroselipid-Säure

Teilzusammenfassung

- Die höchsten Umsätze der eingesetzten Glucuronidasen aus *Helix pomatia* wies der Typ HP-2 mit einer Sulfataseaktivität von 5% auf. Daher wurden nachfolgend Untersuchungen zur Umsetzung im größeren Maßstab vorgenommen.

3.5.2.2 Umsetzung von SLS-DEAC 18:1 mittels Glucuronidase Typ HP-2 aus *Helix pomatia* bzw. Naringinase aus *Penicillium decumbens*

Zur Synthese größerer Mengen an (ω -1)-OH-Fettsäure wurden Versuche im 2L-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Als Biokatalysatoren dienten Glucuronidasen aus *Helix pomatia* und Naringinase aus *Penicillium decumbens*. Die Probenahme erfolgte nach Klärung der Lösung, die nach Abbau der Glu-LS eintrat (Kapitel 3.3.). Der Umsatz der SLS-DEAC wurde über die Glukosekonzentration (Kapitel 2.2.1) detektiert.

In Tab. 12 sind die verschiedenen Versuchsansätze beschrieben. 5 g bzw. 10 g SLS-DEAC wurden in 1,25 L 0,1M Phosphatpuffer (pH=5) gelöst und mit 100 bzw. 200 μ L der Glucuronidaselösung versetzt. Die Reaktion wurde bei 30°C und 120 upm durchgeführt. Nach 7 d betrug der Umsatz 10% . Erneute Zugaben von 100 bzw. 200 μ L Enzymrohlösung ergaben nach insgesamt 9 d einen Umsatz von 22 bzw. 26%. Wiederholte Enzymzugabe führte zu keinem weiteren Anstieg der Glukosekonzentration.

Tab. 12: Produktion der (ω -1)-OH-Fettsäure im g-Maßstab

Nr	Enzym	SL-S [g]*	Enzym-menge	Umsatz [%]	Gesamtreaktionszeit [d]
1	Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i> Typ HP-2	10*	200 μ L	10	7 d
			+200 μ L (7 d)	26	9 d
			+200 μ L (9 d)	23	10 d
2	Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i> Typ HP-2	5	100 μ L	10	7 d
			+100 μ L (7 d)	22	9 d
			+100 μ L (9 d)	19	10 d
3	Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	10	0,5 g	43	4 d
			+ 0,5 (4 d)	38	5 d
4	Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>	10	1g	77	5 d
			+ 0,5 (5 d)	74	6 d

* Lösung in 1,25 L Phosphatpuffer

Des weiteren wurden Versuche mit Naringinase aus *Penicillium decumbens* bei 39°C durchgeführt. Die SLS-DEAC-Konzentration betrug 8 g/L. Mit einem Enzym/Substratverhältnis von 1/20 wurde nach 4 d eine Umsetzung von 43% erreicht, die am 5. Tag auf 38% zurückging.

Die besten Ergebnisse wurden mit einem Enzym/Substratverhältnis von 1/10 erreicht. Hierbei wurde das Ausbeutemaximum von 77% nach 5 Tagen erreicht. Am 6.Tag wurde ein Rückgang auf 74% beobachtet. Wiederholte Enzymzugabe führte nicht zu einem weiteren Anstieg der Glukosekonzentration.

Aufarbeitung

Die wässrige Reaktionslösung wurde um die Hälfte unter Vakuum einreduziert, tiefgefroren und mittels Gefriertrocknung lyophilisiert. Die (ω -1)-OH-Fettsäure wurde durch kontinuierliche Soxhletextraktion mit Cyclohexan isoliert. Vorhandene Phosphatsalze in der organischen Phase wurden mit deionisiertem Wasser extrahiert.

Teilzusammenfassung

- Die besten Resultate wurden mit Ansatz 4 Tab. 12 erzielt. Hier wurde zur Produktion der (ω -1)-OH-Fettsäure im g-Maßstab die Naringinase aus *Penicillium decumbens* in einem Enzym/Substratverhältnis von 1/10 eingesetzt. Die Synthese erfolgte im 2L-Erlenmeyerkolben mit einer Sophoroselipid-Säure-Konzentration von 8 g/L (12,8 mM) bei 39°C und 120 upm. Die Umsetzung betrug nach 5 Tagen 77%.

3.6 Enzymatische Lactonisierung der (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1

Lactone finden ihre Verwendung als Duftstoffe in der Parfümindustrie oder als Antibiotika in der Pharmaindustrie. Die isolierte Sophoroselipid-Säure wurde zunächst zwecks höherer Wertschöpfung hydrolysiert (Kapitel 3.4, S.46 ff.) und anschließend der Lipidteil zyklisiert. Die zuvor gewonnene (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 diene als Ausgangssubstanz zur Herstellung des Makrolactons. Die Substratkonzentration beeinflusst die intramolekulare oder intermolekulare Veresterung. Bei einer Lactonisierung handelt es sich um einen Ringschluss innerhalb des Substratmoleküls. Dieser erfolgt bevorzugt unter hoch verdünnten Bedingungen (1-10 mM).

3.6.1 Enzymscreening

Zur Herstellung des makrozyklischen C-18-Lactons wurden verschiedene Enzyme getestet (Tab. 13). Die Doppelbindung der Fettsäure neigt in polaren, protischen Lösemitteln zur Bildung von Carbokationen. Um die daraus resultierenden Nebenreaktionen wie polare Umlagerungen und Polymerisation zu vermeiden, wurde die Umsetzung in unpolarem Cyclohexan vorgenommen. Die Reaktion wurde nach 12 Tagen mittels DC untersucht (Abb. 30).

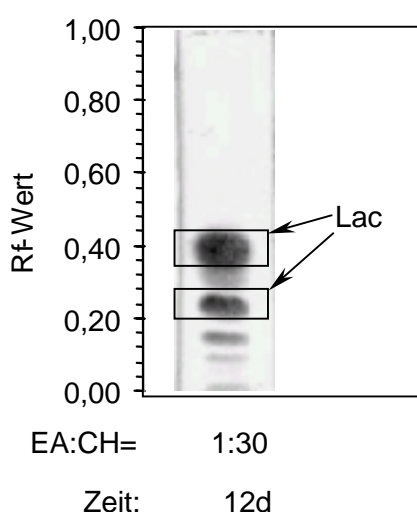


Abb. 30: Die enzymatische Umsetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure zum Lacton (Lac)

Tab. 13: Enzyme zur Lactonisierung der (ω -1)-OH-Fettsäure

Enzym	Umsetzung nach 12 d bei 30°C
Acylase aus <i>Aspergillus melleus</i>	-
Lipase aus Schweineleber	+
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i>	+
Novozym SP 435 (C.A. _{imm})	+
Esterase aus Schweineleber immobilisiert auf Eupergit	+
Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	+
Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i>	+
Lipase aus <i>Candida antarctica</i>	+
Clara-Diastase (Enzymgemisch: α -Amylase, Cellulase, Invertase, Peptidase, Phosphatase, Sulfatase)	-
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	-
Taka-Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i> (Taka-Amylase)	-
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>	-
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	-

+ Umsetzung erfolgt, - keine Umsetzung

3.6.2 Quantifizierung der Lactonbildung

Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte densitometrisch über die Messung noch vorhandener (ω -1)-OH-Fettsäure (Abb. 31).

Die Lipasen aus *Rhizopus niveus* und *Rhizopus dalamar* zeigten keine Lactonisierungsreaktion. Die Lipase aus *Rhizopus niveus* setzte 39% der OH-Fettsäure in ein nicht weiter untersuchtes Produkt um. Größte Umsätze waren mit 89% bei der freien Lipase aus *Candida antarctica* zu beobachten. Die immobilisierte Form der Lipase (C.A._{imm}) lieferte dagegen nur 50% des Lactons.

Lipase aus Schweinemagen und die immobilisierte Esterase aus Schweineleber ergaben jeweils 59% Lacton; die Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* zeigte mit einem Wert von 65% etwas mehr Umsatz.

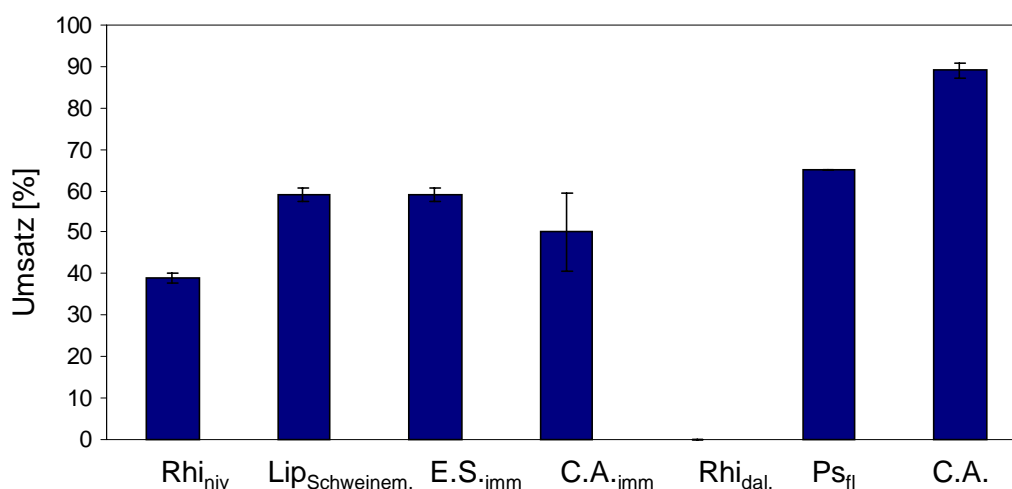


Abb. 31: Enzymatische Umsetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure mit Rhi_{niv}:Lipase aus *Rhizopus niveus*; Lipase_{Schweinem.}: Lipase aus Schweinemagen; E.S._{imm.}: Esterase aus Schweineleber immobilisiert auf Eupergit; C.A._{imm.}: immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica*; Rhi_{dal.}: Lipase aus *Rhizopus dalamar*; PS_{fl}: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, C.A.: Lipase aus *Candida antarctica*

3.6.3 Stereochemie der Lactonisierung

Zur Untersuchung der Spezifität der Reaktion wurden 15-20 mg der Lipasen mit 1mL der 20 mM (ω -1)-OH-Fettsäure inkubiert. Als organisches Lösemittel diente Cyclohexan. Die Reaktionstemperatur betrug 40°C. Die Probenahme erfolgte nach 14 Tagen.

Die stereochemische Zusammensetzung der entstandenen Lactone wurde mittels chiraler DC untersucht (Kap. 3.9., S. 76). Die Spots gleicher Massenzahl (GC-MS) wurden nach Anfärbung mit H₂SO₄/MeOH densitometrisch vermessen (Abb. 33).

Folgende Isomere sind aufgrund der eingesetzten Enantiomeren der (ω -1)-OH-Fettsäure FS-1 und FS-2 denkbar:

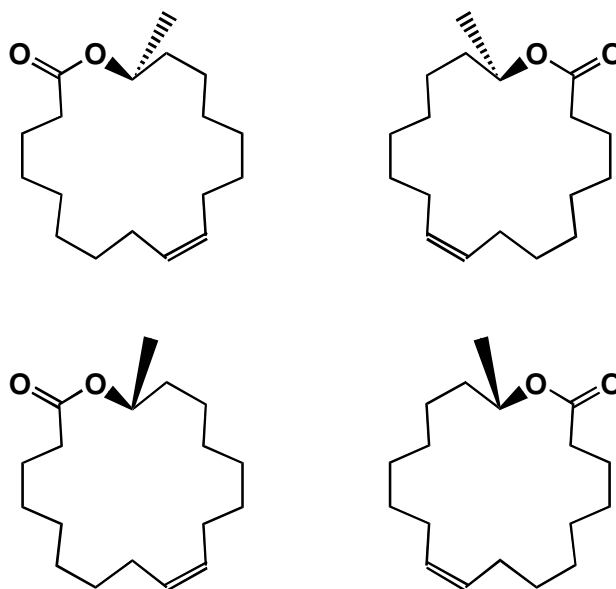


Abb. 32: Mögliche Stereoisomere bei der Umsetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure zum Lacton

Stereoisomeren-Zusammensetzung bei der Umsetzung von (ω -1)-OH-Fettsäure zum Lacton ist in Abb. 33 dargestellt. Die Lipasen aus Schweinemagen, aus *Pseudomonas fluorescens* und aus *Candida antarctica* zeigten eine ähnliche Stereoisomeren-Zusammensetzung und bildeten bevorzugt Lac-1b. Die immobilisierten Enzyme Esterase aus Schweineleber (E.S._{imm}) und Lipase aus *Candida antarctica* (C.A._{imm}) liefern überwiegend Lac-1a. Auffällig ist die unterschiedliche Selektivität von immobilisierter Lipase (Lac-1a-Bildung) und freier Lipase (Lac-1b-Bildung) aus *Candida antarctica*. Lipase aus *Rhizopus dalamar* und *Rhizopus niveus* zeigten keine Umsetzung zum Lacton. Lac-2a wurde von allen getesteten Enzymen nur in geringem Ausmaß (unter 20%) gebildet. Ein mögliches viertes Stereoisomer, resultierend aus FS-2, wurde nicht detektiert.

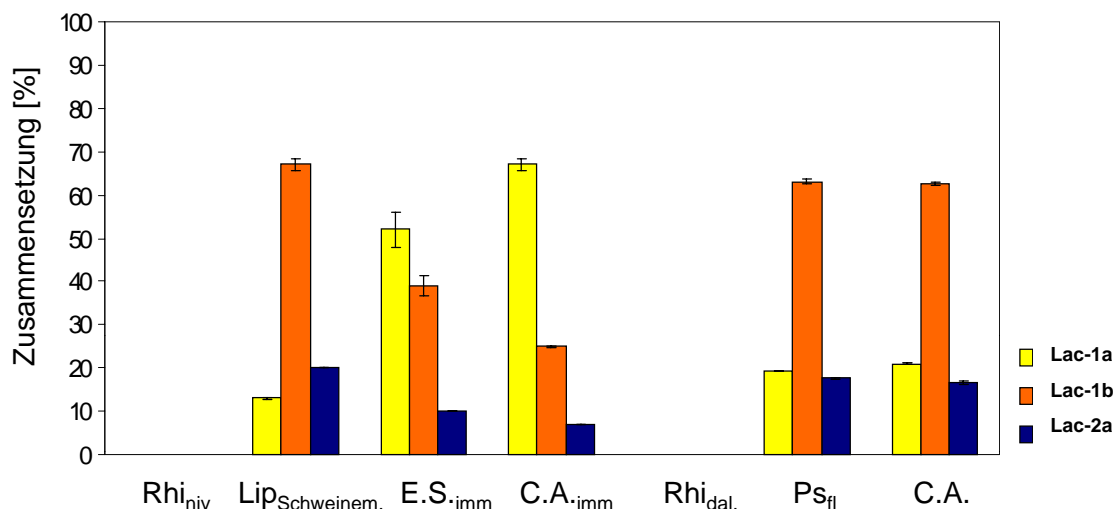


Abb. 33: Stereoisomeren-Zusammensetzung bei der Umsetzung von (ω -1)-OH-Fettsäure zum Lacton (Lac-1a, Lac-1b, Lac-2a) mit: Rhi_{niv}: Lipase aus *Rhizopus niveus*; Lipase_{Schweinem.}: Lipase aus Schweinemagen; E.S._{imm}: Esterase aus Schweineleber immobilisiert auf Eupergit; C.A._{imm}: immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica*; Rhi_{dal}: Lipase aus *Rhizopus dalmatensis*; PS_{fl}: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, C.A.: Lipase aus *Candida antarctica*

3.6.4 Lactonisierung der (ω -1)-OH-Fettsäure mittels C.A._{imm} im g-Maßstab

Die immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* zeigte unter den getesteten Enzymen die besten Ergebnisse bezüglich Quantität und Selektivität. Bei der Veresterung handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Eine Möglichkeit, die Reaktion in Richtung des Lactons zu verschieben, bietet das Abfangen des entstehenden Wassers. Dazu wurden Vorversuche mit einem Molsieb durchgeführt. Die Durchführung der Reaktion erfolgte im Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler. Nach Zugabe des Molsiebes wurden jedoch weder Produkt noch Edukt detektiert. Vermutlich wurden die unpolaren Substanzen adsorbiert. Außerdem wurde durch die Reibung der größeren Molsiebpartikel die immobilisierte Lipase zerstört.

Bei dem Trägermaterial des Enzyms handelte es sich um ein makroporöses Material mit der Fähigkeit, Wasser einzulagern. So kann C.A._{imm} auch als Dehydratisierungsmittel eingesetzt werden. Die weiteren Versuche wurden mit dem immobili-

sierten Enzym im g-Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 2,4 g der Hydroxyfettsäure in 400 mL Cyclohexan gelöst. Als Reaktionsgefäße dienten 500 mL-Erlenmeyerkolben mit Schraubverschlüssen. Die Reaktionstemperatur betrug 50°C. Die Schüttlerfrequenz wurde auf 190 upm eingestellt. Der Verlauf der Reaktion wurde dabei mittels DC (Kieselgel Si 60) verfolgt (Abb. 34). Zur Detektion wurde Sprühreagenz A verwendet.

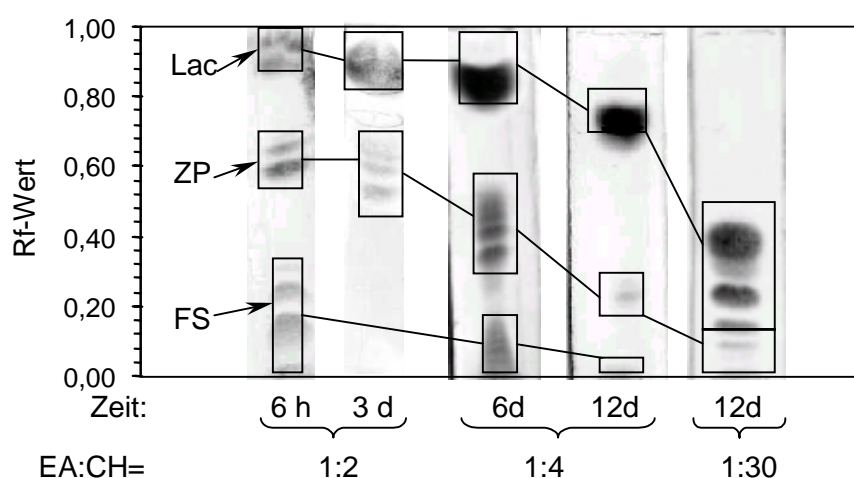


Abb. 34: Umsetzung der (ω -1)-Hydroxyfettsäure mittels C.A._{imm} mit Lac: Lacton, ZP: Zwischenprodukt und FS: (ω -1)-Hydroxyfettsäure; DC: Kieselgel Si60 mit unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen von Ethylacetat (EA) und Cyclohexan (CH).

Neben der Bildung des Lactons ist bis zum dritten Tag ein nicht weiter untersuchtes Zwischenprodukt detektierbar. Eine nahezu vollständige Umsetzung der Hydroxyfettsäure wurde nach 12 Tagen erreicht. Nach Entfernen des Lösemittels wurden die Produkte zunächst mit Hilfe der DFC aufgereinigt. Da die einzelnen Rf-Werte nur geringe Abstände aufwiesen, wurde das Lösemittelverhältnis teilweise über zwei Fraktionen konstant gehalten (Tab. 14).

Es wurden 800 mg Lacton erhalten. Die weitere Auftrennung der Lactonbanden erfolgte über MPLC. Cyclohexan und Ethylacetat dienten in einem Verhältnis von 30/1 als Laufmittel. Als stationäre Phase diente eine mit Kieselgel Si 60 gepackte Säule. Die Produkte wurden durch GC-MS mittels Elektronenionisation unter-

sucht. Zu den Hauptkomponenten zählten zwei Verbindungen mit der für das Lacton erwarteten Massenzahl von $m/z=280$. Bei den Lactonen handelte es sich um zwei Diastereomere (Abb. 32), da sie bei unterschiedlichen Retentionszeiten (7:30 min und 7:40 min) ein nahezu identisches ^1H -NMR-Spektrum und Massenspektrum lieferten.

Tab. 14: Elutionsprofil zur Aufreinigung des Lactons mittels DFC

Fraktion	Lösemittelzusammensetzung: Ethylacetat/Cyclohexan
1	nur Cyclohexan
2	0,0255
3	0,0289
4	0,0289
5	0,0308
6	0,0308
7	0,0315
8	0,0325
9	0,0345

Außerdem wurde eine Übereinstimmung der R_f -Werte mit einer der Verbindungen (F4-7) aus dem chemischen Screening der Sophoroselipid-Säure (Kap. 3.2, S.33) gefunden. Ein Vergleich der Massenspektren aus der GC-MS-Analytik führte zu einer Übereinstimmung der Substanz F4-7 und eines der Lactone. Sie weisen eine nahezu identische Retentionszeit von 7:41 und 7:40 min und ein identisches EI-Massenspektrum (Abb. 35 und Abb. 36) auf.

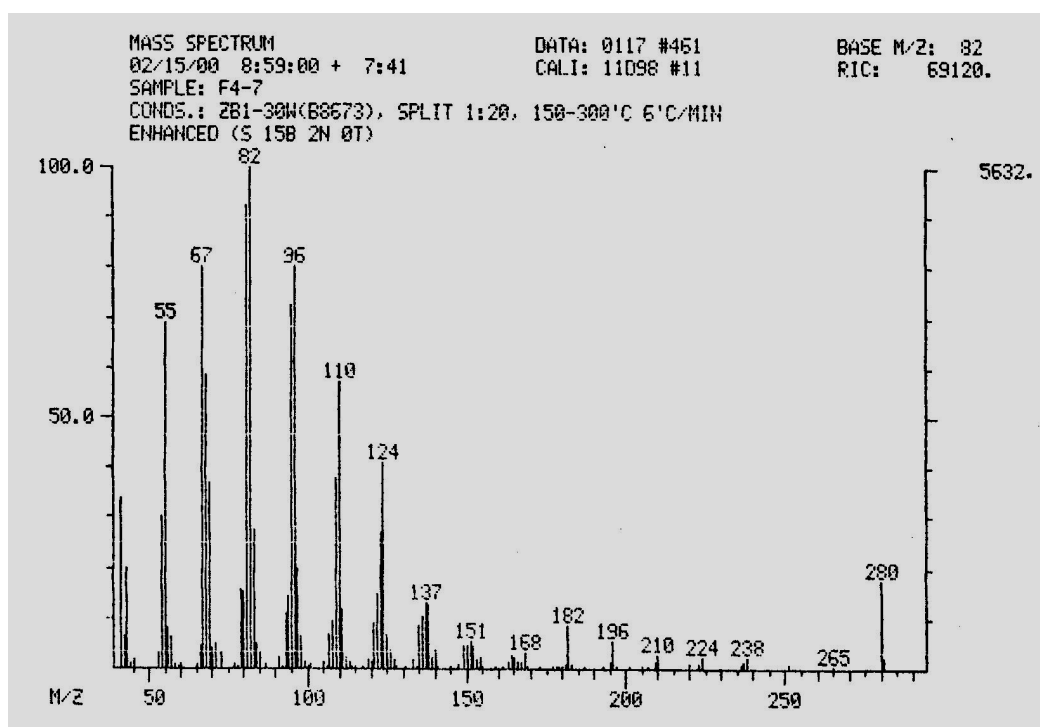


Abb. 35: MS-Spektrum der Fraktion F4-7 aus der chemischen Umsetzung der Sophoroseli-
pid-Säure mit Schwefelsäure.

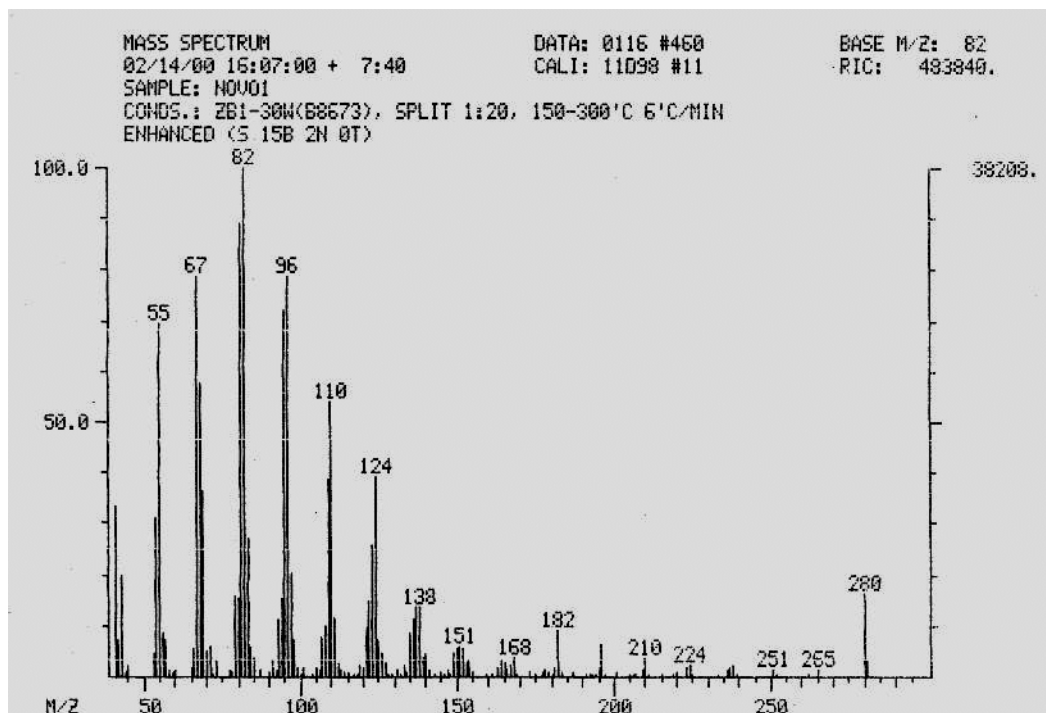
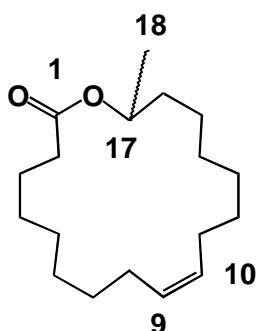


Abb. 36: MS-Spektrum des Lactons. Zyklisierung der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) durch C.A._{imm}
in Cyclohexan

Spektroskopische Daten aus ^1H -NMR, ^{13}C -DEPT und COSY-NMR führten zu folgender Verbindung (Abb. 39):



^1H NMR (CD_3OD) = 5.33 [m, H-9, H-10]; 4.93 [m, H-17], 2.01 [t, H-8, H-11, J(8-9), J(10-11) 5.3]; 2.26 [t, H-2, J(2-3) 6.4]; 1.60 [t, H-3, J(3-4) 7.5]; 1.51-1.37 [m, H-4 bis H-7, H-12 bis H-16]; 1.19 [d, H-18, J (17-18) 6.3].

^{13}C NMR (CD_3OD) δ =173.7 (s, C-1), 130.2, 130.1 (2 x d, C-9, C-10), 77.5 (d, C-17), 36.2 (t, C-16), 35.4 (t, C-2), 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, 28.8 (7 x t, C-4 bis C-7, C-12 bis C-14), 27.2, 27.1 (2 x t, C-8, C-11), 27.0 (t, C-15), 25.6 (t, C-3), 20.4 (q, C-18).

Abb. 37: Lactonisierte Hydroxyfettsäure

3.7 Epoxidierung

Zur Epoxidierung der experimentell gewonnenen Verbindungen wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Es wurden Versuche mit der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS), mit der zyklisierten (Lac) sowie der methylierten (Me-FS) Form und der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1) durchgeführt. Als Katalysator dienten die freie Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.) und die auf einem makroporösen Trägermaterial immobilisierte Form C.A._{imm}.

Außerdem wurde noch der Kationenaustauscher Amberlyst 15 getestet, der als „per-Amberlyst 15“ in etherischer Wasserstoffperoxidlösung zur Epoxidierung

von 4-Methyl-4-naphtoquinol eingesetzt wurde [48]. Als Sauerstofflieferant diente 35%- oder 60%-ige Wasserstoffperoxidlösung. Die Versuche wurden in Cyclohexan (Tab. 15, Tab. 16), tert-Butyl-methylether (MTBE), Toluol, Dichlormethan (DCM) oder Phosphatpuffer (Tab. 17) durchgeführt.

Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Das Vorhandensein der Doppelbindung wurde über eine 0,5%-ige Kaliumpermanganatlösung als Sprühreagenz detektiert. Eine Umsetzung der Doppelbindung war erfolgt (+), wenn der gelbe Spot auf violetterem Hintergrund nicht mehr sichtbar war.

In der Literatur zur chemoenzymatischen Epoxidierung werden verschiedene Lösemittel genannt. Als Kriterium wurden die gute Löslichkeit des Substrates und die gute Verträglichkeit mit dem eingesetzten Enzym herangezogen [49]. Deshalb wurde in den ersten Versuchen Cyclohexan als Lösemittel (Tab. 15) verwendet. Die Substratkonzentration wurde variiert.

Tab. 15: Versuche zur Epoxidierung der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) mit freier (C.A.) und immobilisierter Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.-imm) in Cyclohexan bei unterschiedlichen Konzentrationen

Nr.	Substrat mg [mmol/mL]	Reagenz Vol. [μ L] Σ Gesamtvol.	Katalysator	Lösemittel Vol. Zeit	Ergebnis
1	FS 200 0,003	H ₂ O ₂ (35%) 24 * 10 μ L alle 10 min Σ 240 μ L	C.A. 50 mg	Cyclohexan 250 mL 2d-14d	-
2	FS 200 0,003	H ₂ O ₂ (35%) 24 * 10 μ L alle 10 min Σ 240 μ L	C.A.-imm 1500 mg	Cyclohexan 250 mL 2d-14d	-
3	FS 600 0,402	H ₂ O ₂ (35%) 26 * 10 μ L alle 10 min Σ 260 μ L	C.A.-imm 100 mg	Cyclohexan 5 mL 1d-6d	-
4	FS 50 0,335	H ₂ O ₂ (35%) 2 * 10 μ L alle 20 h Σ 20 μ L	C.A.-imm 25 mg	Cyclohexan 0,5 mL 1d-6d	-

Die Versuche mit der freien Fettsäure in Cyclohexan bei unterschiedlichen Konzentrationen führten zu keiner Epoxidierung. Daraufhin wurde die Fettsäure methyliert, da aus der Literatur zum einen bekannt ist, dass eine Persäurebildung bei Methylestern auch mit 35%-iger Wasserstoffperoxidlösung möglich ist, zum anderen Epoxide durch Perhydrolyse der Ester gewonnen werden können [50].

Tab. 16: Versuche zur Epoxidierung der methylierten (Me-FS) und zyklisierten (Lac) (ω -1)-OH-Fettsäure mit freier (C.A.) und immobilisierter Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.imm) in Cyclohexan

Nr.	Substrat mg [mmol/mL]	Reagenz Vol. [μ L] Σ Gesamtvol.	Katalysator	Lösemittel Vol. Zeit	Ergebnis
5	Me-FS 200 0,003	H ₂ O ₂ (35%) 24 * 10 μ L alle 10 min Σ 240 μ L	C.A. 50 mg	Cyclohexan 250 mL 2d-14d	-
6	Me-FS 200 0,003	H ₂ O ₂ (35%) 24 * 10 μ L alle 10 min Σ 240 μ L	C.A.imm 1500 mg	Cyclohexan 250 mL 2d-14d	-
7	Lac 200 0,003	H ₂ O ₂ (35%) 24 * 10 μ L alle 10 min Σ 240 μ L	C.A.imm 1500 mg	Cyclohexan 250 mL 2d-14d	-

Die Epoxidierung erfolgte weder mit der methylierten noch mit der zyklisierten Fettsäure. Aus der Literatur zur chemischen Epoxidierung durch Persäure ist ein Zusammenhang zwischen Lösemittel und Reaktivität bekannt. Als besonders reaktivierendes Lösemittel wurde DCM beschrieben [51]. Bei den folgenden Versuchsansätzen wurde deshalb das Lösemittel variiert (Tab. 17).

Tab. 17: Versuche zur Epoxidierung der zyklisierten (Lac) , freien(ω -1)-OH-Fettsäure (FS) und der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) mit freier (C.A.) und immobilisierter Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.imm) sowie einem Kationenaustauscher (Amberlyst 15) mit verschiedenen Lösemitteln

Nr.	Substrat mg [mmol/mL]	Reagenz Vol. [μ L] Σ Gesamtvol.	Katalysator	Lösemittel Vol. Zeit	Ergebnis
8	FS 50 0,335	H ₂ O ₂ (35%) 2 * 10 μ L alle 20 h Σ 20 μ L	C.A. _{imm} 25 mg	MTBE 0,5 mL 1d-6d	-
9	FS 50 0,335	H ₂ O ₂ (35%) 2 * 10 μ L alle 20 h Σ 20 μ L	C.A. _{imm} 25 mg	Toluol 0,5 mL 1d-6d	-
10	Lac/FS 600 ca. 4,279/2,139	H ₂ O ₂ (35%) 18 * 10 μ L alle 10 min Σ 180 μ L	C.A. _{imm} 100 mg	Toluol 0,5 mL (0d)+ 0,5mL (2d) 1d-6d	-
11	FS 50 0,335	H ₂ O ₂ (35%) 2 * 10 μ L alle 20 h Σ 20 μ L	C.A. _{imm} 25 mg	DCM 0,5 mL 1d-6d	+
12	FS 160 0,223	H ₂ O ₂ (35%) 250 μ L	Amberlyst 133	MTBE 2,4 mL 2 d	-
13	SLS-DEAC 18:1 100	H ₂ O ₂ (35%) 26 * 10 μ L alle 10 min Σ 260 μ L	C.A. 50 mg	Phosphatpuffer pH=5 50 mL	-
14	SLS-DEAC 18:1+FS 50+5	H ₂ O ₂ /(60%) 2 * 10 μ L alle 20 h Σ 20 μ L	C.A. _{imm} 25 mg	DCM 0,5 mL 1d-4d	+

Eine Epoxidierung fand nur bei Nr.11 und Nr.14 (Tab. 17) mit der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) allein und im Gemisch mit der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) in Dichlormethan (DCM) statt. Die spektroskopische Daten aus der ¹H-NMR-Spektroskopie ergaben, dass bei beiden Reaktionen die epoxidierte OH-Fettsäure (Abb. 39) synthetisiert wurde. Das entstandene Epoxid wurde über DFC isoliert.

Als stationäre Phase diente ein RP-18-Material der Firma Merck und Methanol:Wasser=80/20 (v/v) als Lösemittelgemisch. Die Fraktionsgröße betrug 15 mL, und der Methanolanteil in der mobilen Phase wurde pro Fraktion um 1% gesteigert. Die Zusammensetzung der erhaltenen Fraktionen wurde über DC (RP-18) ermittelt. Die Fraktionen mit einem RF-Wert von 0,63 und einer negativen Reaktion auf wässrige 5%-ige Kaliumpermanganatlösung wurden vereint. Die Reinheitsüberprüfung erfolgte über DC (Abb. 38).

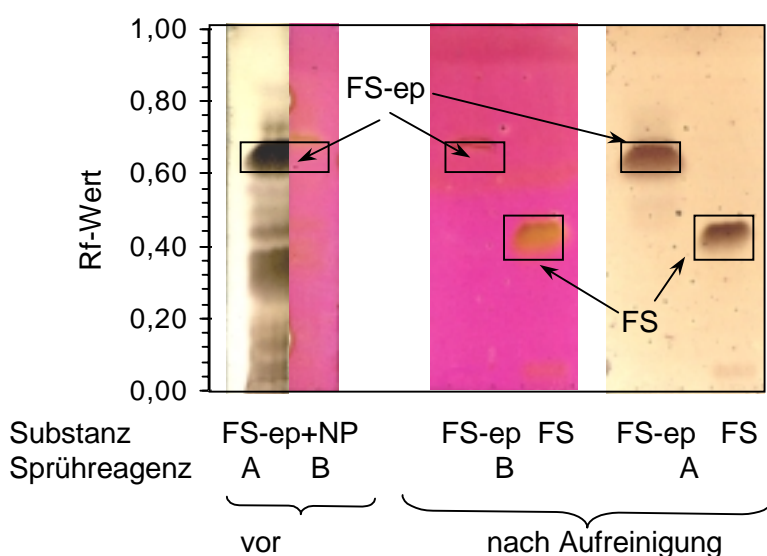
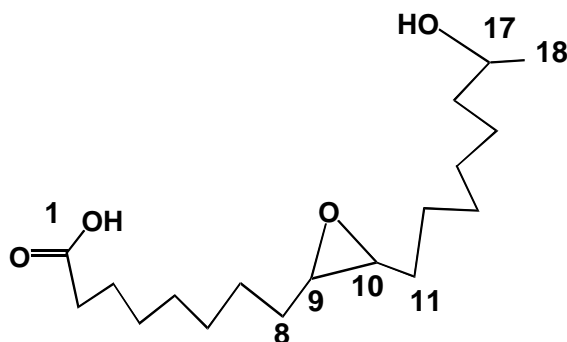


Abb. 38: DC (RP-18/ Laufmittel: MeOH/H₂O(v/v)=4/1) der epoxidierten Fettsäure (FS-ep). mit Sprühreagenz A und Sprühreagenz B vor (mit NP:Nebenprodukten) und nach chromatografischer Aufreinigung. Zur Überprüfung des Reaktionsverlaufes wurde als Vergleich die (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) aufgetragen.

Spektroskopische Daten aus ^1H -NMR, ^{13}C -DEPT und COSY-NMR führten zu folgender Verbindung (Abb. 39):



^1H NMR (CD_2Cl_2) δ =3.8[tq, H-17, J(17-16) 6.3, J(17-18) 6.2], 2.89[m, H-9/10], 2.36 [t, H-2, J(2-3) 7.4], 1.65 [t, H-3, J(3-4) 7.0], 1.51-1.37 [m, H-4 bis H-8, H-11 bis H-16], 1.18 [d, H-18, J (17-18) 6.2].

^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ =179.0 (s, C-1), 68.8 (d, C-17), 57.8 (2 x d, C-9, C-10), 40.1 (t, C-16), 34.7 (t, C-2), 30.4, 30.4, 30.3, 30.1, 29.9, 29.8, 28.6 (7 x t, C-4 bis C-7, C-12 bis C-14), 27.3, 27.3 (2 x t, C-8, C-11), 26.5 (t, C-15), 25.6 (t, C-3), 24.1 (q, C-18).

Abb. 39: Epoxidierte Hydroxyfettsäure

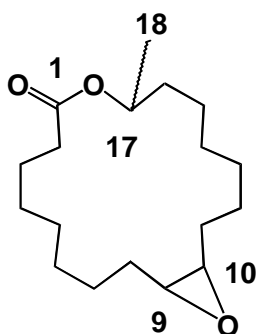
Die Stereochemie wurde mittels chiraler DC (Kapitel 3.9, S.76) untersucht. Es wurde eine Zusammensetzung von 9,3% für FS-ep-1 und 90,7% für FS-ep-2 ermittelt.

3.8 Epoxidierung des Lactons durch Zyklisierung der epoxidierten (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1

Die Epoxidierung des Lactons (Abb. 40) erfolgte durch Zyklisierung der epoxidierten FS. Es wurden hierzu Versuche im 100 mg-Maßstab in verschließbaren 100 mL-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Als Synthesevorschrift diente die der enzymatischen Lactonherstellung aus FS (siehe Kapitel 3.6, S.61).

Abweichend davon wurde nach Beendigung der Reaktion die immobilisierte Lipase mit DCM extrahiert. Die Ausbeute konnte damit von 35% auf 67% gesteigert werden. Eine direkte Epoxidierung des Lactons konnte unter den in Kapitel 3.7 gewählten Reaktionsbedingungen nicht erreicht werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels DFC mit RP-18-Phase. Die Elution wurde durchgeführt mit 15 mL-Aliquoten eines Laufmittelgemisches von Methanol/Wasser(v/v)=4/1. Der Methanolanteil wurde pro Fraktion um 1% gesteigert.

Spektroskopische Daten aus ^1H -NMR, ^{13}C -DEPT und COSY-NMR führten zu folgender Verbindung (Abb. 40):



^1H NMR (CD_3OD) = 4.96 [m, H-17], 2.96[m, H-9,H-10], 2.36 [t, H-2, J(2-3) 6.1], 1.57 [m, H-3], 1.47 [m, H-4 bis H-8, H-11 bis H-16], 1.24 [d, H-18, J(17-18) 6.3]

^{13}C NMR (CD_3OD) δ =175,.5 (s,C-1), 58.7, 58.6 (2 x d, C-9, C-10), 72.1 (d, C-17), 37.2 (t, C-16), 35.6 (t, C-2), 31.0, 30.8, 30.6, 30.4, 30.1, 30.0, 29.8 (7 x t, C-4 bis C-7, C-12 bis C-14), 28.5, 28.2 (2 x t, C-8, C-11), 26.7 (t, C-15), 26.3 (t, C-3), 20.7 (q, C-18)

Abb. 40: Epoxidiertes Lacton

Die Stereoisomeren-Zusammensetzung wurde über chirale DC (Kapitel 3.9, S.76) bestimmt. Lac-ep-1=81,7%; Lac-ep-2=12,4% und Lac-ep-3=5,8%.

3.9 Chirale Dünnschicht-Chromatografie

Zur Quantifizierung der einzelnen Stereoisomere wurden die Proben mittels einer chiralen Festphase getrennt. Es wurden hierzu die DC-Platten Lichrospher der Firma Merck verwendet. Als Laufmittel (LM) wurden zuvor getrocknete Lösemittelgemische aus Cyclohexan (CH), Ethylacetat (EA) und Methanol (MeOH) verwendet.

Für die Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1) wurde ein ternäres Lösemittelgemisch verwendet, da einfache binäre Zusammensetzungen von Ethylacetat/Cyclohexan keine brauchbaren Ergebnisse lieferten. Eine Auftrennung der SLS-DEAC 18:1 in Enantiomere konnte nicht beobachtet werden (Abb. 41).

Die chemisch und enzymatisch gewonnene aufgereinigte (ω -1)-OH-Fettsäure 18:1 wurde mittels eines binären Lösemittelgemisches aufgetrennt. Die Lösemittelzusammensetzungen sind in Abb. 42 dargestellt.

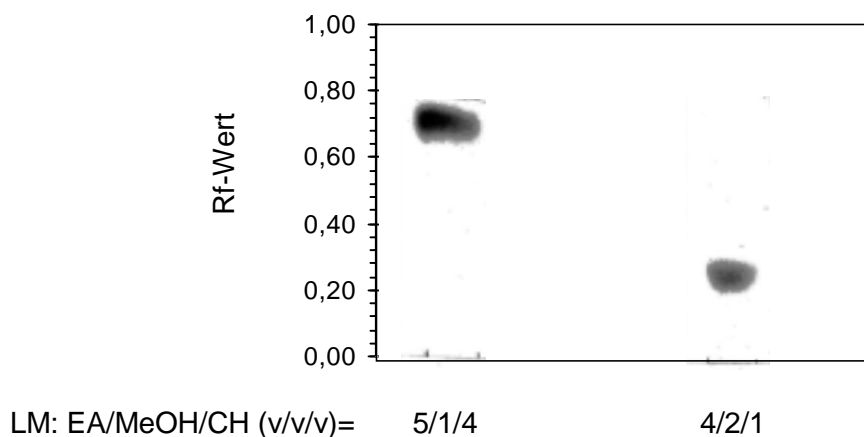


Abb. 41: Chirale DC der zuvor aufgereinigten Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1) bei verschiedenen Lösemittelzusammensetzungen von Ethylacetat (EA), Methanol (MeOH) und Cyclohexan (CH)

Die höchste Auflösung wurde mit einer Lösemittelzusammensetzung von Ethylacetat/Cyclohexan (v/v)= 1/2 erzielt. Für die Quantifizierung wurde der lineare Konzentrationsbereich ermittelt. Dazu wurde das Auftragsvolumen variiert. Bei einem Auftragsvolumen von 30-80 μ L wurde eine Abweichung der Zusammensetzung

zung von bis zu 3% gemessen (Abb. 43). Das entspricht einem Konzentrationsbereich von 3-8 mg/mL, in dem eine gute Reproduzierbarkeit gegeben ist.

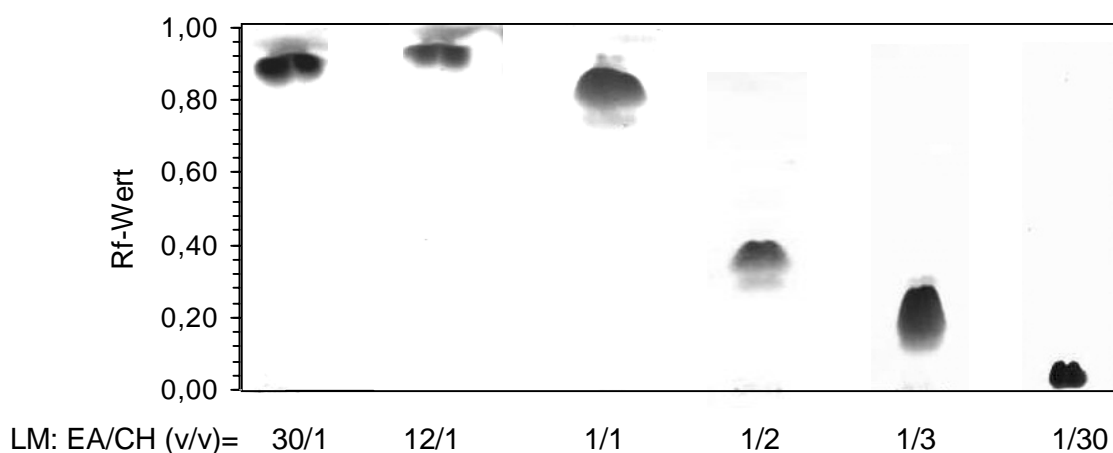


Abb. 42: Chirale DC der zuvor aufgereinigten (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) bei verschiedenen Laufmittel-Zusammensetzungen

Bei der FS-ep wurde aufgrund des ähnlichen Rf-Wertes bezüglich der FS auf eine vollständige Umsetzung von FS geachtet. Die Kontrolle erfolgte mittels DC über das für ungesättigte Verbindungen spezifische Sprühreagenz Kaliumpermanganat (0,5%-ige wässrige Lösung).

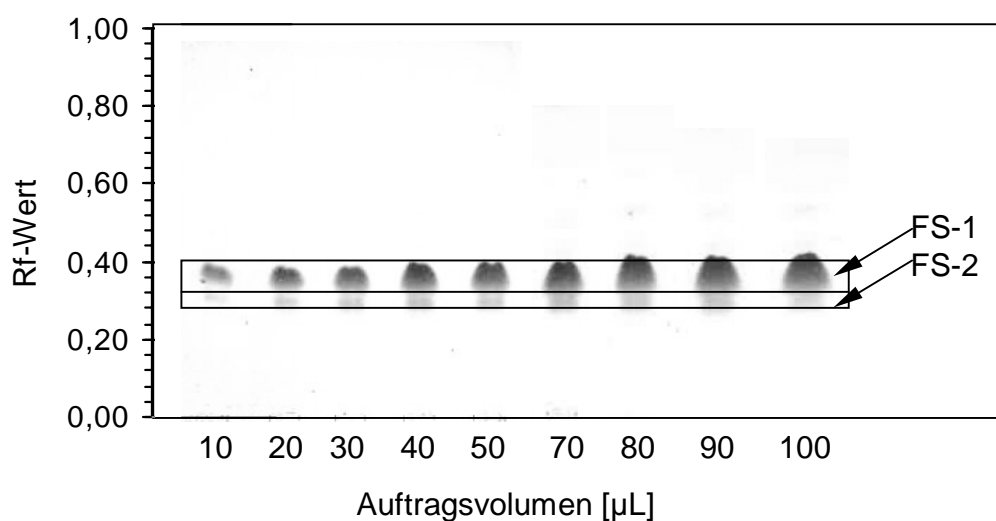


Abb. 43: Chirale DC der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS-1/FS-2) bei einem Lösemittelgemisch von Ethylacetat/Cyclohexan (v/v)= 1/2. Die Auftragung erfolgte in verschiedenen Konzentrationen

Die Lactone (Lac) wurden mittels eines Laufmittelgemisches von Ethylacetat/Cyclohexan (v/v)=1/30 in ihre Stereoisomere getrennt (Abb. 44, links). Für die Separierung der epoxidierten Lactone (Lac-ep-1-3) und der epoxidierten (ω -1)-OH-Fettsäuren (FS-ep-1/FS-ep-2) wurde eine Lösemittelzusammensetzung von Ethylacetat/Cyclohexan (v/v)=1/3 benötigt (Abb. 44, rechts).

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte am rechnergesteuerten Densitometer (Kapitel 2.3.6, S.22). Die prozentuale Zusammensetzungen bzw. die ee-Werte der untersuchten chiralen Verbindungen sind von den Reaktionsbedingungen und verwendeten Enzymen abhängig. Die Ergebnisse hierzu sind in den jeweiligen Kapiteln (FS: Kap. 3.4.3, S.49; Lac: Kap. 3.6.3, S.63; Lac-ep: Kap. 3.8, S.74; FS-ep: Kap. 3.7, S.69) wiedergegeben.

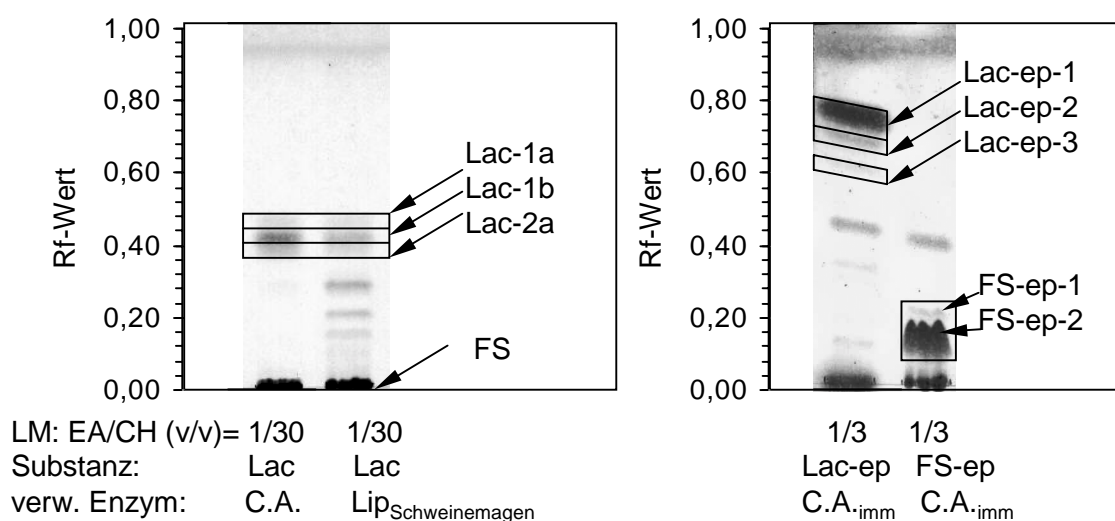


Abb. 44: Chirale DC des Lactons (Lac), des epoxidierten Lactons (Lac-ep) und der epoxidierten (ω -1)-OH-Fettsäure (FS-ep); abgebildet sind die Isomere (Lac-1a, Lac-1b, Lac-2a) des Lactons, resultierend aus der Umsetzung der (ω -1)-OH-Fettsäure (FS) mittels freier Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.) und Lipase aus Schweinemagen (Lip_{Schweinemagen}); die Isomere Lac-ep-1, Lac-ep-2, Lac-ep-3, FS-ep-1 und FS-ep-2 wurden mittels der immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica* (C.A._{imm}) gewonnen

3.10 Pharmazeutische Tests

Ziel der Tests war, die zytostatische/zytotoxische Wirkung einzelner Substanzen auf das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* zu bestimmen. Dazu wurden die Tumorzelllinien HMO2 (Magenkarzinom) und Hep G2 (Leberkarzinom) (Kapitel 2.5, S.24) und mit den in Abb. 45 dargestellten Verbindungen inkubiert.

Aus den Konzentrationswirkungskurven wurden die in Tab. 18 und Tab. 19 dargestellten Grenzwerte bestimmt.

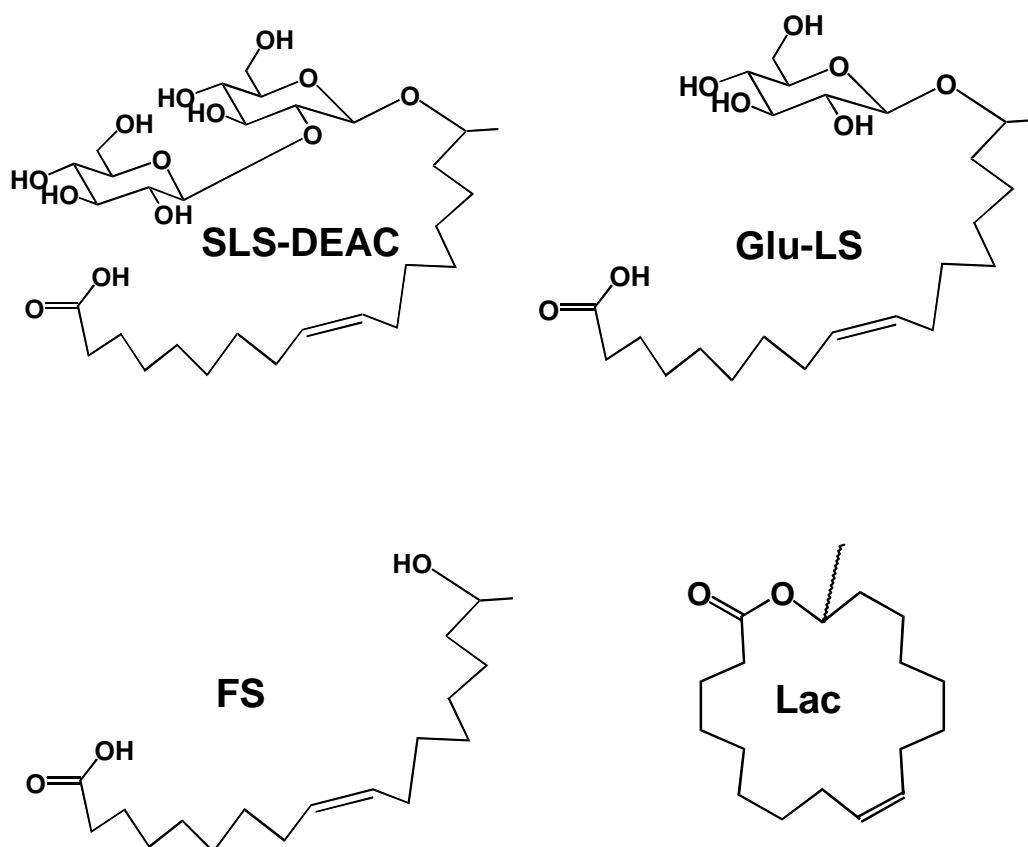


Abb. 45: Eingesetzte Substanzen (FS aus chemischer Hydrolyse (Kapitel 3.5.1) und Lac aus enzymatischer Lactonisierung mittels C.A.-imm (Kapitel 3.6.4)) zur Untersuchung von zytostatischer und -toxischer Wirkung auf Tumorzelllinien

Tab. 18: Tumorzelllinie: HMO2 (Magenkarzinom)

Substanz	GI50 [$\mu\text{g/mL}$]	TGI [$\mu\text{g/mL}$]	LC50 [$\mu\text{g/mL}$]
SLS-DEAC 18:1	>10	>10	>10
Glu-LS	2,9	>10	>10
Lac	>10	>10	>10
FS	1,3	>10	>10

GI50: Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

TGI: Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

LC50: Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt und nach 24 h die initial vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.

Tab. 19: Tumorzelllinie: Hep G2 (Leberkarzinom)

Substanz	GI50 [$\mu\text{g/mL}$]	TGI [$\mu\text{g/mL}$]	LC50 [$\mu\text{g/mL}$]
SLS-DEAC 18:1	>10	>10	>10
Glu-LS	1,8	3,4	>10
Lac	>10	>10	>10
FS	3,1	>10	>10

GI50: Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

TGI: Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.

LC50: Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt und nach 24 h die initial vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.

SLS-DEAC 18:1 und Lac sind mit Werten >10 $\mu\text{g/mL}$ unwirksam. Glu-LS und FS zeigen zytotoxische Wirkungen. Bei der Bewertung der TGI-Werte (Konzentration, die zu einer vollständigen Hemmung des Zellwachstums führt) war zu beachten, dass alle wirksamen Substanzen das Zellwachstum um 80-90% hemmten. Sie lagen 2-3 fach über dem GI50-Wert. Eine 100% -ige Hemmung wurde aber nicht erzielt.

4. Diskussion

4.1 Produktspektrum mikrobiell gewonnener Sophoroselipide

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Hydroxyfettsäure dienten die mikrobiell gewonnenen Sophoroselipide (SL). Über 20 verschiedene Sophoroselipide wurden detektiert [27], [52]. Sie unterscheiden sich im Acylierungsgrad der Sophorose, in der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad des lipophilen Fettsäureanteils, und sie liegen als Lacton oder freie Säure vor.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es, die Sophoroselipide dergestalt aufzuarbeiten, dass sich eine maximale Ausbeute an C-18:1-Fettsäure ergab.

Das Substrat hat unmittelbare Auswirkungen auf das Produktspektrum [53], [33], [54], [55]. Als Kohlenstoffquellen können neben Kohlenhydraten wie Glukose [16], [12], Saccharose [56], Laktose [57], Fruktose oder Mannose [58] auch hydrophobe Grundstoffe wie n-Alkane [59], 2-Alkanole [55], Pflanzenöle [14], [60], [61], [57], [31], [24], tierische Fette [62], [61], Fettsäuren [33], Fettsäuremethyl- oder Ethylester [61], [30] dienen. Auch Industrieabfälle wie Molke [10] oder deproteiniertes Weizen [11], [54] wurden verwendet.

Der Einfluss der C-Kettenlänge eingesetzter Fettsäure(-ester) auf den hydrophoben Teil der SL wurde bei der Hefe *Candida (Torulopsis) magnoliae* untersucht. Substrate mit weniger als 15 C-Atomen zeigten keine signifikante Umsetzung oder Hydroxylierung der Fettsäuren. Aus organischen Verbindungen mit einer C-Kettenlänge über 18 resultieren gewöhnlich C-17 oder C-18 Hydroxyfettsäuren. C-16 bis C-18 Verbindungen wurden ohne Änderung ihres Kohlenstoffgerüsts in die entsprechenden Hydroxyfettsäuren überführt [28]. Kultivierungen der Hefe *Candida bombicola* auf technischer Ölsäure und Sojaöl zeigen ähnliche Ergebnisse betreffend der C-18-Fettsäuren. Der Anteil an C18:1 und C18:2 wurde unverändert in die SL transferiert. Ein Vergleich des Fettsäurespektrums bezüglich der eingesetzten Substrate und der entstandenen SL zeigte jedoch, dass die C-16-Fettsäuren entweder vollständig verstoffwechselt oder durch Verknüpfung

mit C-2-Einheiten in C18:0-Fettsäuren umgewandelt wurden [33]. Wurde dem gleichen Stamm (ATCC 22214) jedoch ein reines C-16-Substrat in Form von n-Hexadecan angeboten, so wurden nur lactonisierte SL mit einem lipophilen C16:0-Anteil detektiert [63], [64], [65].

Der Sättigungsgrad des lipophilen Fettsäureanteils wird neben dem Substrat auch mit von der Sauerstofftransferrate beeinflusst. Für die SL Produktion auf Ölsäure wurde ein optimaler Sauerstoffeintrag von 50-80 mM O₂/L*h gefunden. Werte, die unterhalb des Optimums liegen, führen zu einer Anreicherung der gesättigten Sophoroselipid-Säuren [38].

Außerdem wurde beobachtet, dass bei geringer Konzentration an Hefeextrakt (< 5 g/L; Maximum bei 1 g/L) der Anteil zyklischer SL insbesondere bei langer Kultivierungsdauer (550 h) zunimmt [36].

4.2 Aufarbeitung mikrobiell gewonnener Sophoroselipide

Die Isolierung gelöster Sophoroselipide aus der Zellsuspension erfolgte über Extraktion mit Ethylacetat [66], [67] oder einem Gemisch aus Ethylacetat/Isopropanol (v/v=4:1) [54]. Überschüssiges Öl oder Fettsäuren wurden mit einem hydrophoben Lösemittel entfernt [68]. Die wässrige Lösung wurde dazu mit n-Hexan bei RT unter Rühren vermischt, und die Phasen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2000 x g getrennt [66], [36]. Ein rohkristallines Produkt wurde durch Umkristallisation aus ein- oder mehrwertigen Alkoholen erhalten [67]. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen und der Zusammensetzung des wässrigen Nährmediums wurden Sophoroselipid-Gemische unterschiedlicher Konsistenz und Zusammensetzung hergestellt.

Diente Glukose als alleinige Kohlenstoffquelle so präzipitierte eine Sophoroselipid-Phase mit einem Wassergehalt von 45%. Ein Abtrennen des Wassers durch Lösemitlextraktion war aufgrund der hohen Viskosität (1500 mPa bei 30°C) der Sophoroselipide nur schwer möglich [69].

Die Sophoroselipide liegen im Kulturmedium als ölige Phase vor, die sich während der Kultivierung von *Torulopsis apicola* absetzen [70]. Wasserlösliche Sophoroselipide wurden mit dem Hefestamm der Art *Torulopsis apicola* erhalten [71]. Eine aufwendige Isolierung und geringe Ausbeute sind hier die Nachteile. Ein Fortschritt wurde durch die Gewinnung rohkristalliner Sophoroselipide durch Veränderung der Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle und dem Zusatz einer Carbonsäure oder von Salz erzielt. So wurde zunächst eine polare Kohlenstoffkomponente (Kohlenhydrate) unter Zusatz der Carbonsäure - des Salzes, die/das selber nicht als C-Quelle diente, fast bis zum vollständigen Umsatz kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe einer apolaren C-Quelle (n-Alkane, Öle oder Kohlenwasserstoffe) [67]. Bei einem Überschuss an Ölsäure während der Kultivierung wurde ein pastöses, mit Fettsäure verunreinigtes Sophoroselipid erhalten. Lag jedoch die Menge an zugegebener Ölsäure unterhalb ihrer Verbrauchsrate, fiel ein mikrokristallines Produkt aus [33].

Die Vereinfachung des Aufarbeitungsprozesses durch Bildung mikrokristalliner Sophoroselipide wurde von Hommel 1992 patentiert. Entscheidend ist hierbei das molare C/N-Verhältnis. Lag dieses zwischen 20 und 100, wurde ein Produkt mit tetraedrischen Kristallen beobachtet. Darüber hinaus wurde bei hydrophilen C-Quellen ein C/N-Verhältnis von 10-80 und bei hydrophoben C-Quellen von 10-65 als optimal für die Bildung mikrokristalliner Sophoroselipide ermittelt [63].

Die Isolierung der präzipitierten SL erfolgte durch einfache Filtration [63] oder Dekantieren [33], [35] mit anschließendem Waschen mit Wasser [33, 35, 63] oder geeignetem Lösemittel zur Beseitigung von Medienbestandteilen [63]. Eine Separierung der Glukolipide wurde durch Pasteurisieren [35] oder Erhitzen auf 60°C [14] der Kulturbrühe verbessert. Das erhaltene Rohprodukt weist jedoch noch einen hohen Anteil von ca. 50% w/w an Wasser auf, der aber durch Gefriertrocknung entfernt werden kann [33]. Ein Einsatz von organischen Extraktionsmitteln und Trockenmitteln wie wasserfreiem Magnesiumsulfat oder Natriumsulfat [28] kann so vermieden werden.

Die weiteren Aufarbeitungsschritte differieren entsprechend der gewünschten Zielsubstanz. Aufgrund ihrer antibakteriellen [20] und Antitumor-Eigenschaften [26], [72] sind die lactonisierten Sophoroselipide von besonderem Interesse. Ihre Aufreinigung gelang aufgrund der geringen Löslichkeit von lactonisierten Sophoroselipiden gegenüber der deacetylierten Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) in Phosphatpuffer (pH=6,5) bei Raumtemperatur [68].

Soll die stabilere, deacetylierte SLS-DEAC gebildet werden, so werden mittels Hydrolyse die beiden Acetylgruppen entfernt, und gleichzeitig wird die Lactonbindung geöffnet. Freiwerdende Essigsäure kann abdestilliert werden. Pentanol bietet als Extraktionsmittel die Möglichkeit, selektiv die SLS-DEAC zu isolieren. Der Alkohol ist nicht wasserlöslich und eignet sich somit auch zur Entsalzung des Produktes [14]. Das komplexe Gemisch wurde zur Analyse chromatografisch mit Kieselgelsäulen aufgetrennt [73], [64], [54].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chromatografische Verfahren entwickelt, die es erlauben, Sophoroselipide und deren Derivate im 10 g-Maßstab aufzureinigen. Zunächst galt es, mittels DC ein Laufmittelgemisch zu finden, das ohne halogenierte Lösemittel auskommt. Die zu trennenden Sophoroselipide lagen nach der alkalischen Hydrolyse als Säure vor. Sie besaßen im Gegensatz zu den lactonisierten Sophoroselipiden eine höhere Polarität. Als Verunreinigungen traten hauptsächlich Fettsäuren auf, die durch Extraktion mit Cyclohexan nicht vollständig entfernt wurden. Auf halogenierte Lösemittel wie Chloroform, die bei Kieselgel aufgrund des hohen polaren Charakters der aufzutrennenden Substanzen erforderlich wären, konnte durch den Einsatz eines „reversed phase“ Materials verzichtet werden. Aufgrund der „umgekehrten“ Polarität der stationären Phase konnten die halogenierten Lösemittel durch ein Wasser/Methanol-Gemisch ersetzt werden. Eine Zersetzung der Probe auf der Säule oder beim Entfernen des Lösemittels [74] wurde nicht beobachtet, da es sich bei der SLS-DEAC um eine relativ stabile Form der Sophoroselipide handelt [75].

Ein chromatografisches Verfahren, mit dem sich bis zu 10 g SL aufreinigen lässt, ist die MPLC. Sie bietet den Vorteil eines kontinuierlichen Verfahrens mit simultaner Detektion der einzelnen Phasen. Als Detektor wurde ein Differential-Refraktometer verwendet, das auf die Änderung des Brechungsindex reagiert. Die Reinheit der Proben wurde über DC bestimmt. Eine andere Methode zur Aufreinigung ist die DFC. Dabei handelt es sich um ein diskontinuierliches Verfahren, bei dem im Gegensatz zur MPLC ein Lösemittelgradient eingesetzt wird. Der Nachteil der Methode ist, dass die Proben nicht online mittels eines Detektors vermessen werden können. Der Vorteil der Methode ist die kurze Verweildauer der Probe auf der kurzen Säule, für die nur geringe Mengen an Säulenmaterial benötigt werden. Durch eine geschickte Wahl des Gradienten kann die aufzureinigende Substanz innerhalb weniger Fraktionen isoliert werden. So war z.B. die epoxidierte Hydroxy-Fettsäure schon in der 7. Fraktion enthalten. Verbindungen, die durch die MPLC getrennt wurden, traten aufgrund der Länge der Säule und der damit verbundenen längeren Verweilzeit erst in Fraktion 36 auf. Der Verbrauch an Lösemitteln ist bei der MPLC aufgrund der notwendigen Vorkalibrierung und der abschließenden Reinigung der Säule erheblich. So wurden für die Trennung von 10 g SLS-DEAC 10 L Lösemittel benötigt. Die Trennung von 2x 5g Sophoroselipid-Säure mittels DFC benötigte nur 4 L Lösemittel. Das würde einer Ersparnis von 60% entsprechen. Dennoch bietet die MPLC besonders bei komplexeren Gemischen die besseren Trennergebnisse. Die MPLC führt im Vergleich zur DFC zu einer Bandenverbreiterung. Die betreffende Substanz kann dann aus der Mitte des Peaks „herausgeschnitten“ werden. Je nach Trennproblem wurde für jede Substanz die Trennmethode individuell ausgewählt.

4.3 Modifikation der Sophoroselipide

Ein Ziel dieser Arbeit war die Vereinheitlichung der Sophoroselipide zwecks Generierung eines homogenen Startmaterials, um eine maximale Ausbeute der C18:1-Hydroxy-Fettsäure zu erreichen. Es galt, die acetylierten und lactonisierten Sophoroselipide in die deacetylierte Sophoroselipid-Säure zu überführen. Die Acetyl-

und Lactonbindungen sind chemisch instabil und leicht unter schwach alkalischen Bedingungen (pH 9-10) bei RT zu spalten. Diese Reaktion wird auch durch Mineralsäuren katalysiert. Selbst in neutraler Umgebung wurden durch Erhitzen oder längere Lagerung die oben genannten Bindungen gelöst. Die erhaltene deacetylierte Sophoroselipid-Säure ist chemisch stabil [69]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Deacetylierung mittels 5 N Natronlauge durchgeführt. Eine saure Hydrolyse führt insbesondere in protischen Lösemitteln zur Protonierung der Doppelbindung. Die Nebenreaktionen des entstehenden Carbokations beinhalten dann nukleophile Substitutionen, Polymerisationen oder Umlagerungen. Folglich wurde auf eine säurekatalysierte Reaktion verzichtet. Außerdem bietet die alkalische Verseifung den Vorteil einer vollständigen Umsetzung. Als Hauptprodukt wurde das in Abb. 46 rechts abgebildete Sophoroselipid erhalten.

Von besonderem Interesse ist die biologische Aktivität des Moleküls. Ein Hinweis für eine mögliche Chiralität ist das Vorhandensein von asymmetrischen Zentren. Die in Abb. 46 gezeigten Sophoroselipide besitzen mit dem sp^3 -hybridisierten C-17-Kohlenstoffatom ein tetraedrisch koordiniertes Atom mit vier unterschiedlichen Substituenten und somit ein asymmetrisches Zentrum. Diese Bedingung ist aber nur ausreichend, wenn nicht durch das Auftreten zweier (oder mehrerer) zueinander spiegelbildlicher Asymmetriezentren eine achirale Verbindung entsteht. Anhand der Symmetrieelemente eines Moleküls lässt sich entscheiden, ob eine Chiralität vorliegt. Das Fehlen einer intramolekularen Drehspiegelachse ist eine notwendige und hinreichende Bedingung dafür. Mittels chiraler DC konnte nachgewiesen werden, dass nur ein Enantiomer der SLS-DEAC gebildet wurde. Dieses korreliert auch mit den Ergebnissen von Tulloch et. al [16] und Steffen [76], die über optische Untersuchungen eine *L*-Konfiguration des asymmetrisch substituierten C-17-Atoms der Fettsäure postulieren (Abb. 46). Enantiomere können sehr unterschiedliche biologische Effekte hervorrufen. Das Medikament Thalidomide z. B. wurde 1960 als Racemat (*R*+*S* Enantiomer) verkauft. Das (*R*)-Enantiomer wies eine beruhigende Wirkung auf, während das (*S*)-Enantiomer eine bis dahin noch nicht bekannte fruchtschädigende Wirkung besaß [77], [78]. Dieses klassische Beispiel zeigt die enorme Wichtigkeit der enantioselektiven

Synthese und Reinheit der Produkte, die für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden sollen. Daneben sind Beispiele aus der Literatur bekannt, bei denen Enantiomere unterschiedliche sensorische Eigenschaften aufweisen: (*R*)-Asparaginsäure als Süßungsmittel und (*S*)-Asparaginsäure mit einem bitteren Geschmack oder (*R*)-Terpen Alkohole mit Lilienduft und (*S*)-Terpen Alkohole mit Geruch nach kaltem Pfeifenrauch [79]. Bei den durchgeführten Modifikationen wurde deshalb auf eine stereoselektive Umsetzung der SLS-DEAC geachtet. Folgende funktionelle Gruppen im Sophoroselipid bieten die Möglichkeit einer chemischen oder enzymatischen Umsetzung:

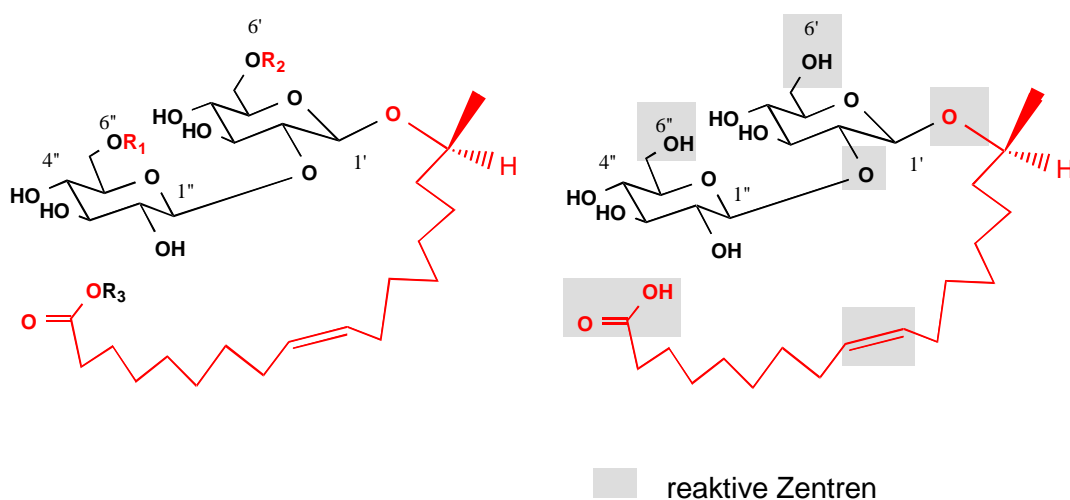


Abb. 46: Offene Form der (*L*)-Sophoroselipide (links) und der deacetylierten (*L*)-Sophoroselipid-Säure (rechts)

Neben den sekundären Hydroxylgruppen der Sophorose sind vor allem die grau unterlegten Gruppen für eine Modifikation von Bedeutung. In Tab. 20 sind einige aus der Literatur bekannte chemisch oder enzymatisch veränderte SL aufgeführt. Primäre Hydroxylgruppen (R_1 und $R_2=H$) und die Carboxylgruppe bieten die Möglichkeit der Veresterung (Nr.1-10, 12-13).

Tab. 20: Modifizierte Sophoroselipide

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Form	Verbindung	Ref.
1	CH ₃ CO	CH ₃ CO	C ₂ H ₅ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
2	CH ₃ CO	CH ₃ CO	CH ₃ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
3	HOOC(CH ₂) ₂ CO	HOOC(CH ₂) ₂ CO	CH ₃ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
4	CH ₃ CO	CH ₃ CO	C ₄ H ₉ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
5	-	CH ₂ =CHCO	-	Lacton	Glc-Glc-1'-6''-C18:1	[80]
6	-	H	-	Lacton	Glc-Glc-1'-6''-C18:1	[80]
7	CH ₂ =CHCO	CH ₂ =CHCO	CH ₃ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
8	H	H	CH ₃ O	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[80]
9	H	H		Lacton	Glc-Glc-1'-4''-C18:0	[81]
10	CH ₃ CO	H		Lacton	Glc-Glc-1'-4''-C18:1	[52], [54]
11	H	H	H	Säure	Glc-1'-C18:1	[47]
12	H	H	CH ₃ (CH ₂) _n n=1,3,9	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[26]
13	CH ₃ CO	CH ₃ CO	CH ₃ (CH ₂) _n n=1,3,9	Ester	Glc-Glc-1'-C18:1	[26]

C18:1=17-L-*cis*-9-octodecensäure; C18:0=Oktadekansäure

Zusätzlich wurde an Position R₁ und R₂ neben der Estergruppe eine Carboxylgruppe als funktionelle Gruppe eingeführt (Tab. 20, Nr.3). Bei Nr. 5 und 7 wurde durch Umsetzung mit Vinylacrylat eine zusätzliche Doppelbindung eingefügt, die im Falle von Nr. 5 als Ausgangsverbindung zur Herstellung eines Polymers diente [82].

Nativ ist im Sophoroselipid die Fettsäure über die 1'-4''-Hydroxylgruppen der Sophorose als Makrolacton gebunden [52]. Die Lactonisierung über die 1'-6''-Bindung gelang Bisht et al. über die enzymatische Umsetzung der methylierten Sophoroselipid-Säure in wasserfreiem Tetrahydrofuran (Tab. 20, Nr.5 und 6). Als Enzym diente die immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* (C.A._{imm}).

Durch Abspaltung eines Glukosemoleküls wurde eine Glukoselipid-Säure (Glu-LS) erhalten (Tab. 20, Nr. 11), deren Produktion im Rahmen dieser Arbeit optimiert wurde. Zur Produktion des Glukolipids nach Rau et al. 1999 [47] wurde bei einem pH-Wert von 9 und einer Temperatur von 40°C eine Zeit von 30 h benötigt. Die Reaktionsdauer konnte bei der Verwendung eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH=5) um 90% reduziert werden. Die Glukoselipid-Säure wird hier als Intermediat innerhalb weniger Stunden gebildet. Die Abspaltung einer weiteren Glukoseeinheit führt zur Entstehung der (ω -1)-OH-Fettsäure. Die Herstellung der Hydroxy-Fettsäuremethylester aus Sophoroselipiden durch alkalische Hydrolyse wurde von Spencer et al. [28] beschrieben.

Die (ω -1)-OH-Fettsäure stellt eine Ausgangsverbindung für weitere Modifikationen dar. Die Existenz von Carboxyl- und Hydroxylgruppen in einem Molekül bietet die Möglichkeit der intramolekularen Lactonisierung. Die Doppelbindung kann oxidiert oder epoxidiert werden. Auch Substitutionsreaktionen und Polymerisation sind denkbar. Die Wahl der Reaktionsbedingungen, die im folgenden diskutiert wird, bestimmt die Selektivität der Reaktion.

4.4 Chemische Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1)

Bei der chemischen Hydrolyse sollte primär die Hydroxy-Fettsäure freigesetzt werden. Als Katalysator dienten Mineralsäuren. Schwefelsäure ist im Gegensatz zur Salzsäure eine oxidierende Säure und kann die Sophorose der Sophoroselipid-Säure oxidieren. Außerdem dient sie in konzentrierter Form als Trocknungsmittel und katalysiert damit auch Veresterungen. Daneben ist sie bei Anwesenheit von Sauerstoff in der Lage, Hydroperoxide zu generieren, die zur Epoxidierung von Doppelbindungen führen. Die große Anwendungsbreite von Schwefelsäure

bot zunächst die Möglichkeit einer unspezifischen Modifikation der Sophoroselipid-Säure. Die auf diese Weise gewonnenen Verbindungen fanden später bei der spezifischen Modifikation als Referenzsubstanzen ihre Anwendung. Von besonderem Interesse waren die geruchsaktiven Fraktionen. Sie wurden durch DFC weiter aufgetrennt und mittels GC-MS untersucht. Die nach Moschus riechenden Substanzen konnten jedoch nicht durch enzymatische Umsetzung der SLS-DEAC synthetisiert werden. Die makrozyklischen Lactone mit einer Ringgröße von 18 wiesen nur einen schwachen süßlichen Geruch auf. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den geruchsaktiven Substanzen um Verbindungen mit kleinerer Ringgröße handelt. Verbindungen wie Cyclohexadecanolide weisen einen moschusartigen Geruch auf [83].

4.5 Enzymatische Hydrolyse der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1)

Geringe Ausbeuten und die niedrige Spezifität bei der chemischen Umsetzung der Sophoroselipid-Säure führten zu der Überlegung, die Reaktion mit Hilfe der Biokatalyse durchzuführen. Für die organische Synthese reichen oft käuflich erwerbba-re Enzyme oder Enzymgemische aus. Hochreine Enzympräparationen sind erst dann sinnvoll, wenn das Rohenzym unerwünschte Nebenaktivitäten aufweist, die zu Nebenreaktionen führen.

Als *Screeningmethode* wurde die Dünnschicht-Chromatografie gewählt, die den Vorteil bietet, viele Proben simultan zu vermessen. Das charakteristische Färbereagenz α -Naphthol bietet zudem die Möglichkeit, aufgrund seiner Färbung zwischen Glukolipid, Kohlenhydrat und Fettsäure zu unterscheiden.

4.5.1 Aufarbeitung des Reaktionsgemisches

Wichtig für die Syntheseplanung ist neben der Verfügbarkeit der Biokatalysatoren auch die Aufarbeitung der Reaktion. Ein nicht unerhebliches Problem stellt hierbei die Emulsionsbildung dar, die aus der amphiphilen Struktur der Sophoroselipid-Säure resultiert. Eine verstärkte Tendenz zur Emulsionsbildung wurde bei geringen Umsätzen der Sophoroselipid-Säure unterhalb von 50% beobachtet. Nicht umgesetztes Substrat kann im wässrigen Puffersystem zusammen mit freigesetz-

ter Fettsäure und hydrophobem Extraktionsmittel zu einer kolloiden Verteilung führen. Eine Phasentrennung ohne Emulsionsbildung ist durch Zugabe von Cyclohexan oder n-Hexan möglich. Die Fettsäure geht dabei in die organische Phase über. Bei der Herstellung der Hydroxyfettsäure im g-Maßstab wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und anschließend kontinuierlich in einer Soxhlet-Apparatur mit Cyclohexan extrahiert. Das Problem der Emulsionsbildung wurde damit umgangen, und zusätzlich wurde Lösemittel eingespart.

4.5.2 Einteilung der Glukosidasen

Ziel der Reaktion war es, das Aglykon, in diesem Fall die Hydroxy-Ölsäure, von der Sophorose zu trennen. In Vorversuchen zur enzymatischen Hydrolyse wurde die Reaktionslösung ohne weitere Aufarbeitung analysiert. Als Biokatalysatoren wurden Enzyme getestet, die C-O-Bindungen hydrolysieren. Dazu zählen Lipasen, die hauptsächlich Esterbindungen spalten, Enzymgemische wie Clara-Diastase und Glukosidasen, die speziell glukosidische Bindungen angreifen.

Die Glukosidasen gehören zu der Familie der Hydrolasen. Sie katalysieren die Spaltung der glukosidischen Bindung zwischen zwei Kohlenhydrateinheiten oder zwischen einem Glykon und einem Aglykon. Die Unterteilung der Enzyme kann auf verschiedene Weise erfolgen.

- *exo*-Glukosidasen greifen nur die terminalen Zuckerreste an, während *endo*-Glukosidasen zudem noch in der Lage sind, eine Kohlenhydratkette in der Mitte zu spalten.

- Einteilung durch IUPAC-IUBMB erfolgt mit Hilfe der *EC (Enzyme Commission)* Nummern. Die erste Ebene beschreibt den Reaktionstyp, die zweite die gruppenspezifische Wirkung und die dritte die Substratspezifität.

3. Hydrolasen

3.2 Glukosidasen

3.2.1 hydrolysiert O-Glukoside

3.2.2 hydrolysiert N-Glukoside

3.2.3 hydrolysiert S-Glukoside

- Gelegentlich unterscheidet man die Enzyme nach dem molekularen Mechanismus der Reaktion: Bei *retentiven* Glukosidasen hat das C-1-Atom, das mit dem glukosidischen Sauerstoff des Zuckers verbunden ist, nach erfolgter Hydrolyse die gleiche Konfiguration, während es bei *inversen* Glukosidasen entgegengesetzt konfiguriert ist.
- Klassifizierung aufgrund ihres strukturellen Aufbaus: Aufgrund der Primärstruktur, die sich in der Aminosäuresequenz widerspiegelt lassen sich die Glukosidasen in *Familien* einteilen. Hier wurden bis zum Jahr 2000 ca. 80 Familien gefunden [84]. Weitere Informationen hierzu sind in den Veröffentlichungen [85], [86] und [87] zu finden. Da es einen direkten Zusammenhang zwischen der Sequenz und Ähnlichkeiten in der Proteinfaltung gibt, hilft diese Unterteilung, evolutionäre Beziehungen zwischen den Enzymen aufzudecken. Außerdem liefert diese Einteilung Informationen über den Mechanismus der Reaktion. Ausgehend von der EC-Einteilung kann nach dem entsprechenden Enzym gesucht werden. Die sich daraus ergebende Familie liefert Informationen über die an der Reaktion beteiligten reaktiven Seitenketten im aktiven Zentrum des Enzyms. Daneben wird die Stereochemie der Reaktion bezüglich der Kohlenhydratkomponente am C-1-Atom angegeben.

- Befindet sich das Sauerstoffmolekül der zu spaltenden glukosidischen Bindung in der äquatorialen Ebene des Zuckerrings, handelt es sich um β -Glukosidasen oder bei axialer Stellung um α -Glukosidasen.
- Neben der Abfolge der Aminosäuren gibt es noch weitere Gemeinsamkeiten, die die Zusammenfassung verschiedener Familien in *Clans* erlaubt [88],[85]. Mit Hilfe von Röntgenkristall-Strukturanalysen lassen sich für viele Familien ähnliche 3-D-Strukturen bestimmen [89]. Die einem Clan zugehörigen Familien besitzen eine analoge Proteinfaltung mit identischen, katalytisch wirksamen Seitenketten, lokalisiert in einer vergleichbaren Sekundärstruktur mit gleicher Stereochemie bezüglich des Substrates (Inversion oder Retention) und ihrer Bindungsspezifität (axiale oder äquatoriale glukosidische Bindungen) [85].

Tab. 21: Einteilung der verwendeten Glukosidasen aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten ,[90], [87]

Enzym	EC-Nr. ¹	Familie ² Clan	Funktion als Base ³	Funktion als Säure ³	Stereo- chemie ⁴ α/β -Sub. ⁵
Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i> Komplex aus a) und b)					
a) α -L-Rhamnosidase	3.2.1.40	78 n.b.	n.b.	n.b.	n.b. α
b) β -Glukosidase	3.2.1.21	1 GH-A	Glu	Glu	ret β
		oder 3 n.b.	Asp	Glu	ret β
Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i> Komplex aus a) und b)					
a) α -L-Rhamnosidase	3.2.1.40	78 n.b.	n.b.	n.b.	n.b. α
b) β -Glukosidase	3.2.1.21	1 GH-A	Glu	Glu	ret β
β -Glukosidase aus Mandeln	3.2.1.21	1 GH-A	Glu	Glu	ret β
α -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	13 GH-H	Asp	Glu	ret α
α -Amylase aus <i>Bacillus subtilis</i>	3.2.1.1	13 GH-H	Asp	Glu	ret. α
Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.4	5 GH-A	Glu	Glu	ret. β

1: EC-Nummer nach IUPAC-IUBMB; 2: Einteilung nach [90]; [87]; 3: an der Reaktion beteiligte Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei die zweite Carboxylgruppe der Glutaminsäure (Glu) oder Asparaginsäure (Asp) in der Reaktion als Säure oder Base fungiert; 4:ret.: retentives Enzym; inv.: inverses Enzym; 5: α : spaltet α -Glucoside, β :spaltet β -Glucoside; n.b.:nicht bekannt

Tab 21 (Fortsetzung): Einteilung der verwendeten Glukosidasen aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten ,[90], [87]

Enzym	EC-Nr. ¹	Familie ² Clan	Funktion als Base ³	Funktion als Säure ³	Stereo- chemie ⁴ α/β -Sub. ⁵
Cellulase aus <i>Trichoderma reesei</i>	3.2.1.4	45	Asp	Asp	inv. β
β -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i>	3.2.1.31	2 GH-A	Glu	Glu	ret. β
Taka Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i> : (Taka-Amylase A [91])	3.2.1.1	13 GH-H	Asp	Glu	ret
Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i>	3.2.1.31	2 GH-A	Glu	Glu	ret β
Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Clara Diastase (En- zymgemisch e) bis j)					
e) α -Amylase	3.2.1.1	13 GH-H	Asp	Glu	ret α
		oder 57	Glu	n.b.	ret α
f) Cellulase	3.2.1.4	5 GH-A	Glu	Glu	ret. β
		oder 8	Asp	Glu	ret
g) Invertase	3.2.1.26	32 GH-J	n.b.	n.b.	ret
		oder 68 GH-J	n.b.	n.b.	ret
h) Peptidase	3.4.14.5	-			
i) Phosphatase	3.1.3.2	-			
j) Sulfatase	3.1.6.1	-			

1: EC-Nummer nach IUPAC-IUBMB; 2: Einteilung nach [90]; [87]; 3: an der Reaktion beteiligte Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei die zweite Carboxylgruppe der Glutaminsäure (Glu) oder Asparaginsäure (Asp) in der Reaktion als Säure oder Base fungiert; 4:ret.: retentives Enzym; inv.: inverses Enzym; 5: α : spaltet α -Glucoside, β :spaltet β -Glucoside; n.b.:nicht bekannt

Als weitere übergeordnete hierarchische Strukturebene gelten die *Faltungen* (*folds*): ohne Berücksichtigung von katalysierter Reaktion oder molekularem Mechanismus werden die einzelnen Clans aufgrund ihrer globulären 3-D-Proteinstruktur zusammengefasst [86]. Über die Hälfte der strukturell erfassten Familien weisen eine $(\beta/\alpha)_8$ -Walzenstruktur auf [86], [92], [93]: acht parallele β -Stränge sind von acht Helices umgeben und bilden eine Walze. Die gestreckten Bänder mit Pfeilspitze repräsentieren die β -Faltblattstruktur und die gewundenen Bänder stellen die α -helicale Struktur in Abb. 47 dar. Die fadenartig erscheinenden Peptidsegmente nehmen eine Knäuel- oder Schleifenkonformation ein. Da von dem verwendeten Enzym Naringinase keine 3-D-Proteinstruktur zur Verfügung stand, wurde die $(\beta/\alpha)_8$ -Walzenstruktur mit Hilfe der A-Domäne des Enzyms Cyclodextringlukotransferase aus *Bacillus circulans* veranschaulicht (Abb. 47):



Abb. 47: Ribbonmodell der Cyclodextringlukotransferase aus *Bacillus circulans* mit seinen verschiedenen Domänen. A zeigt das bei Glukosidasen weit verbreitete katalytische Zentrum mit $(\beta/\alpha)_8$ -Walzenstruktur [93].

4.5.3 Substratspezifität

Die Einteilung der Glukosidasen kann, wie in Kapitel 4.5.2 gezeigt wurde, aufgrund der Stellung des Sauerstoffatoms am anomeren Zentrum oder aufgrund des strukturellen Aufbaus des Enzyms erfolgen. Im Sophoroselipid ist die

1'-OH-Gruppe β -glukosidisch mit der ungesättigten (ω -1)-OH-Fettsäure verknüpft. Somit wurde eine Substratumsetzung nur von Glukosidasen oder Enzymgemischen mit β -Glukosidaseaktivität erwartet. Es ist jedoch auch denkbar, dass eine Enzympräparation mit einer α -Glukosidaseaktivität Sophoroselipid-Säure hydrolysiert, wenn sie mittels einer nicht dokumentierten Enzymnebenaktivität eine β - in eine α -Verknüpfung invertiert.

α -Amylase aus *Bacillus licheniformis*, α -Amylase aus *Bacillus subtilis* und Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae* zeigten keine Reaktion gegenüber dem Sophoroselipid. Dies war aufgrund ihrer Bindungsspezifität gegenüber α -Glukosiden zu erwarten.

Freigesetzt wurde die Hydroxyfettsäure von Enzymen mit β -Glukosidaseaktivität. Dazu zählten Naringinase aus *Penicillium decumbens*, Clara Diastase, Taka Diastase aus *Aspergillus oryzae*, Hesperidinase aus *Aspergillus niger*, β -Glukosidase aus Mandeln, β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2, Cellulase aus *Aspergillus niger* und Galactomannase aus *Aspergillus niger*.

Auffällig ist, dass die Enzyme alle dem Clan GH-A angehören, der als eine strukturelle Gemeinsamkeit die $(\beta/\alpha)_8$ -Walzenstruktur (Abb. 47) aufweist. Dies spricht für eine Struktur-Substrat-Beziehung.

Die Ausbeuten konnten durch Variation des pH-Wertes (5 oder 7) und der Temperatur (4, 20 und 37°C) optimiert werden. Es ist hier keine eindeutige Tendenz bezüglich der Reaktionsbedingungen erkennbar. Dies kann mit dem unterschiedlichen strukturellen Aufbau neben der $(\beta/\alpha)_8$ -Walzenstruktur erklärt werden. Wie aus Kapitel 4.5.2, S.94, Tab. 21 ersichtlich ist, gehören die verwendeten Glukosidasen unterschiedlichen Familien an.

Die Ausbeute der Hydroxyfettsäure wird auch durch die Glukosetoleranz der einzelnen Glukosidasen mitbestimmt. Folglich resultieren die niedrigen Umsätze (maximale Ausbeute von 48%) der Hesperidinase aus *Aspergillus niger* (einem Komplex aus β -Glukosidase und α -L-Rhamnosidase) wahrscheinlich aus einer

Inhibierung der β -Glukosidase durch Glukose. In der Literatur sind Inhibierungskonstanten von 3-10 mmol/L für β -Glukosidase bekannt [94]. Die Reaktionslösung besaß eine Sophoroselipid-Säurekonzentration von 3 g/L. Die Maximalkonzentration von Glukose bei einer vollständigen Umsetzung beträgt somit 9,6 mmol/L. β -Glukosidase aus Mandeln wird dagegen erst bei einer Glukosekonzentration von 50 mmol/L zu 10% inhibiert [95]. Die Inhibierung durch Glukose kann hier bei der Umsatzbetrachtung vernachlässigt werden.

4.5.4 Stereospezifität

Cellulase aus *Aspergillus niger* (pH=7) und Galactomannase aus *Aspergillus niger* (pH=5), β -Glukosidase aus Mandeln (pH=7), und β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ HP-2 (pH=7) zeigen bei höchster Hydrolyserate entsprechend ihrem Temperaturoptimum auch die größte Spezifität. Naringinase aus *Penicillium decumbens* wies mit einem ee-Wert von rund 95% bei pH=5 die höchste Stereospezifität auf. Diese Werte waren temperaturunabhängig. Eine Umsetzung in neutraler Umgebung dagegen zeigte eine klare Tendenz zu größerer Spezifität bei höheren Temperaturen und sinkender Hydroxyfettsäurekonzentration.

4.5.5 Mechanismus

Es ist davon auszugehen, dass die Sophorose als ganzes nur von *endo*-Glukosidasen abgespalten werden kann. Exo-Glukosidasen dagegen setzen in einem zweistufigen Mechanismus sukzessive die beiden Glukosemoleküle frei [96], [97]. Eine *endo*- bzw. *exo*-Aktivität der Enzyme wurde vom Hersteller nicht angegeben. Bei den durchgeführten Vorversuchen wurde keine *endo*-Aktivität, die mit einer Freisetzung der Sophorose einhergehen würde, beobachtet.

Versuche zum zeitlichen Verlauf der Reaktion wurden mit Naringinase aus *Penicillium decumbens* durchgeführt. Hier nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit der Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) mit steigender Temperatur zu. Folglich ist sie bei 0°C nach 7d, bei 20°C nach 263 min und bei 37°C nach 235 min nahezu vollständig umgesetzt. Mit abnehmender Sophoroselipid-Konzentration wurde ein Anstieg der Glukolipid-Konzentration (Glu-LS) beobachtet. Während die

(ω -1)-OH-Fettsäure (FS) bei 37°C schon nach 57 min freigesetzt wurde, ist bei 20°C nach 263 min keine FS neben Glu-LS und SLS-DEAC detektierbar. Bei 0°C hat selbst nach 7 d noch keine Hydrolyse stattgefunden. Das Vorhandensein von Glu-LS legt den Schluss nahe, dass es sich bei der enzymatischen Umsetzung von SLS-DEAC um eine zweistufige Reaktion handelt, bei der nacheinander zwei Glukosemoleküle freigesetzt werden. Dies ist auf die β -Glukosidase-Aktivität der Naringinase zurückzuführen, die als Komplex aus β -D-Glukosidase und α -L-Rhamnosidase vorliegt [98], [99]. Sie besitzt als „natürliches“ Substrat das Naringenin-7-(α -L-rhamnosyl)-2- β -glukosid (Naringin) und ist deshalb auch unter der Bezeichnung α -L-Rhamnosidase bekannt. Inhibierend wirken L-Rhamnose und Glukose [98], [99]. Für Glukose wurde eine Inhibierungskonstante von 430 mM angegeben. Diese hohe Glukosetoleranz des Enzyms erklärt auch, dass selbst bei hohen Substratkonzentrationen von 32 mM Sophoroselipid noch eine Steigerung der Anfangsgeschwindigkeit zu beobachten war. Die in der Literatur gemessenen kinetischen Parameter für Naringinase bezogen sich nur auf die α -L-Rhamnosidaseaktivität. So wurde für das freie Enzym ein K_M -Wert von 7,0 mM gemessen [98]. Dieser zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Mittelwert, der in der vorliegenden Arbeit für die β -Glukosidaseaktivität der freien Naringinase mit $K_M=6,98$ mM ermittelt wurde. Für v_{max} wurde ein Wert von umgerechnet $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L*s von Romero *et. al* [98] gemessen. Dieser ist vergleichbar mit der in Kapitel 3.3.3 berechneten Konstante für $v_{max}=3,94 \cdot 10^{-6}$ mol/L*s.

Die β -Glukosidase besitzt als katalytisch wirksame Seitengruppe zwei Glutaminsäuren, die sowohl als Säure als auch in deprotonierter Form als Base fungieren (siehe auch S.94, Tab. 21). Das retentive Enzym beeinflusst während der Hydrolyse nicht die Konfiguration am anomeren C-Atom.

Ein anerkannter Mechanismus zur glukosidischen Hydrolyse wurde zuerst von Koshland [100] postuliert. Er erklärt die Retention der Zuckerkomponente durch einen 2-stufigen Prozess, bei dem sich zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex bildet. Dabei erfolgt eine glukosidische Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, wobei das Aglykon (ROH) abgespalten wird. Im zweiten Schritt wird der

Enzym-Substrat-Komplex dann durch Wasseranlagerung ans anomere Zentrum hydrolysiert. Diese These wurde von der Annahme untermauert, dass im aktiven Zentrum der Glukosidasen zwei Carbonsäureseitenketten die Hydrolyse unterstützen. So wirkt die eine Carbonsäure in anionischer Form als Base und greift am anomeren Zentrum an, während die andere in kationischer Form als Säure wirkt und das Aglykon (-OR) protoniert (Abb. 48).

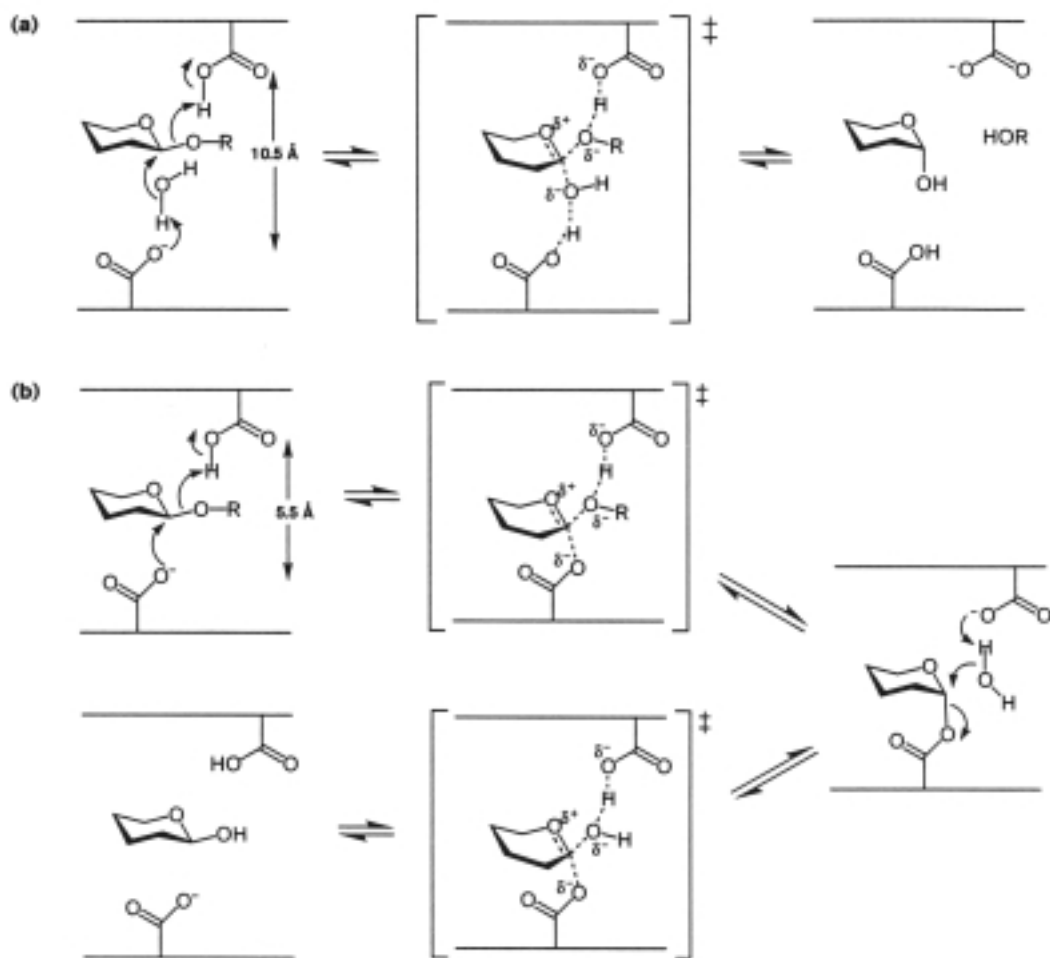


Abb. 48: Allgemeiner Reaktionsverlauf der Hydrolyse eines Glukosids mittels einer β -Glukosidase mit (a) Inversion und (b) Retention der Konfiguration am C-1-Sauerstoff [84]

Die Funktion der protonierten Carbonsäure als Säurekatalysator wurde unter anderem durch Versuche mit deuteriertem Lösemittel [101] und Messung der kinetischen Isotopeneffekte des ^{18}O des Aglykons [102] experimentell gestützt.

Die Funktion der zweiten als Anion vorliegenden Carbonsäure im aktiven Zentrum ist dagegen nicht eindeutig geklärt: entweder agiert sie als *Nukleophil* und unterstützt die Abspaltung des Aglykons [103],[104],[105] (Abb. 48) oder sie stabilisiert *elektrostatisch* den Übergangszustand des Glukosyl-oxocarbeniumions [106].

Letztendlich ist das Intermediat, dessen Stabilisierung für die Effizienz der Enzymreaktion entscheidend ist, nicht eindeutig geklärt. Handelt es sich um ein hochreaktives Zwischenprodukt mit relativ kurzer Lebensdauer, so gestalten sich direkte Untersuchungen hierzu oft schwierig. Verschiedene indirekte Methoden können in Kombination Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus liefern:

- Kinetischer Isotopeneffekt, [107], [108], [109], [110]
- Röntgen-Kristall-Struktur-Analyse, [111], [112], [113]
- Spektroskopische Methoden, [114], [115], [116]
- Computermulation, [117], [118]
- Mutation, [119], [120], [121], [122], [123], [124]

4.5.5.1 Spezifität und Mutation

Die Funktion charakteristischer Seitenketten in der Proteinstruktur der Glukosidasen wurde mit Hilfe von gerichteter Mutation untersucht [119], [120], [121], [122], [123], [124]. Die Hydrolyse des Glukosids benötigt zwei Carbonsäuren, die je nach Mechanismus unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Während in einem retentiven Mechanismus (Abb. 48b) Säure1 als Säure/Base-Katalysator und Säure2 als Nukleophil/Fluchtgruppe fungieren, nehmen bei einer inversen Stereochemie der

Reaktion (Abb. 48a) Säure1 den Platz einer Säure und Säure2 in deprotonierter Form den einer Base ein. Mutation der Seitenkette Glu358 (Glutaminsäure) in Asp (Asparaginsäure) erhöht den Abstand der Seitenketten im katalytischen Zentrum und verringert die Aktivität. Sie führt aber nicht zu einer Änderung des Reaktionsverlaufs (Abb. 48). Wird Glu358 jedoch durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt und das fehlende Nukleophil durch Natriumazid, so wird aus der retentiven β -Glukosidase aus *Argobacterium sp.* ein inverses Enzym [122].

4.5.5.2 Einfluss des Substrates auf den Reaktionsmechanismus

Ähnlich der chemischen Hydrolyse, die über einen SN_1 oder SN_2 Mechanismus ablaufen kann, gibt es in der enzymatisch katalysierten Reaktion verschiedene Wege. Neben dem Einfluß von Temperatur, Enzym und pH-Wert spielt auch das Substrat selber eine gewichtige Rolle. Einige Glukosidasen sind in der Lage, Dimere abzuspalten, andere wiederum spalten nur monomere Zuckereinheiten ab.

Wird das Substrat während der Deglukosilierung betrachtet, so kann zwischen Glykon (Kohlenhydratkomponente) und Aglykon (der Teil, der vom Zuckermolekül getrennt wird) unterschieden werden. Das Aglykon agiert während der Reaktion als Fluchtgruppe. Entsprechend seiner Struktur und Reaktivität werden verschiedene Reaktionswege vorgeschlagen. Weniger reaktive mit basischer Fluchtgruppe versehene Substrate, wie z.B. das Arylgalactosid *p*-Nitrophenyl- β -D-Galactosid werden vom Enzym einer SN_2 -analogen Reaktion unterworfen [125]. Dies entspricht dem in Abb. 49 mit k_2 dargestellten Weg. Die Hydrolyse mit sehr reaktiven Substraten wie dem 2,4-dinitrophenyl- β -D-Galactosid dagegen läuft eher über ein enzymgebundenes Enzym-Galactosyl-Kation-Intermediat ab (k_3 in Abb. 49). Dieses geht dann via k_4 in das kovalent gebundene Galactosyl-Enzym über, oder es wird über k_6 direkt Galactose freigesetzt. Ein Umkippen der Reaktion in umgekehrter Richtung k_{-4} wird dagegen nur selten beobachtet [125].

Als Substrate wurden in der vorliegenden Arbeit die Sophoroselipid-Säure und intermediär die Glukoselipid-Säure verwendet. In Abb. 14, S.40 ist deutlich erkennbar, dass die SLS-DEAC wesentlich schneller umgesetzt wird als die Glu-LS. Die Glukoselipid-Säure fungiert im ersten Schritt der enzymatischen Hydrolyse als Fluchtgruppe (k_3 in Abb. 49). Im zweiten Schritt wird die weniger reaktive Hydroxy-Fettsäure (k_2 in Abb. 49) freigesetzt.

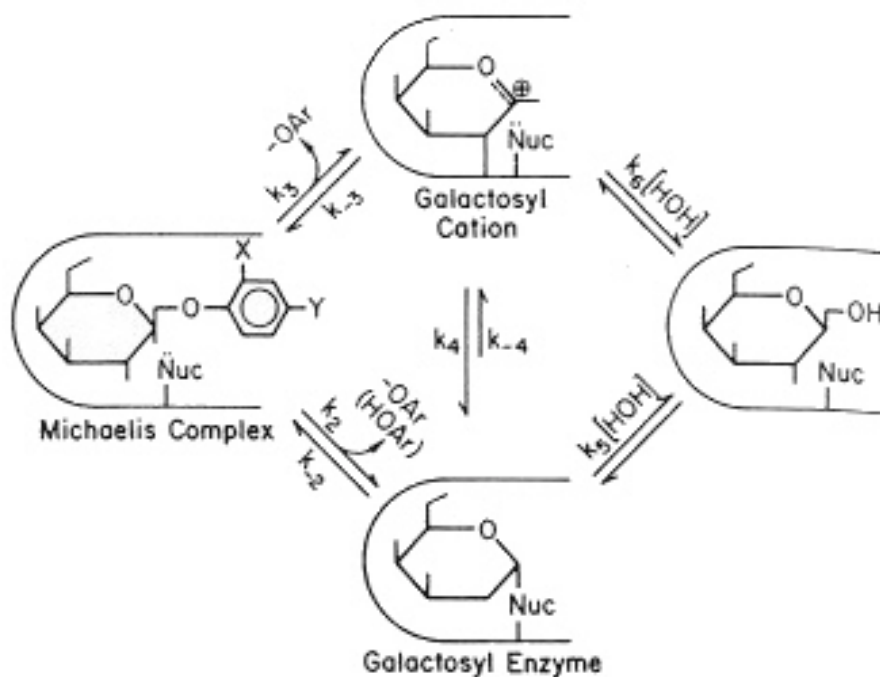


Abb. 49: Mechanismus der β -Galactosidhydrolyse in Abhängigkeit der Substratstruktur und -reaktivität (Abb. übernommen aus [125])

4.5.5.3 Stereospezifische Freisetzung der Hydroxyfettsäure

Ein Mechanismus, der die stereospezifische Freisetzung des Aglykons, in diesem Fall der Hydroxy-Ölsäure beschreibt, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Analog zu Abb. 48, S.100 kann folgender Mechanismus postuliert werden:

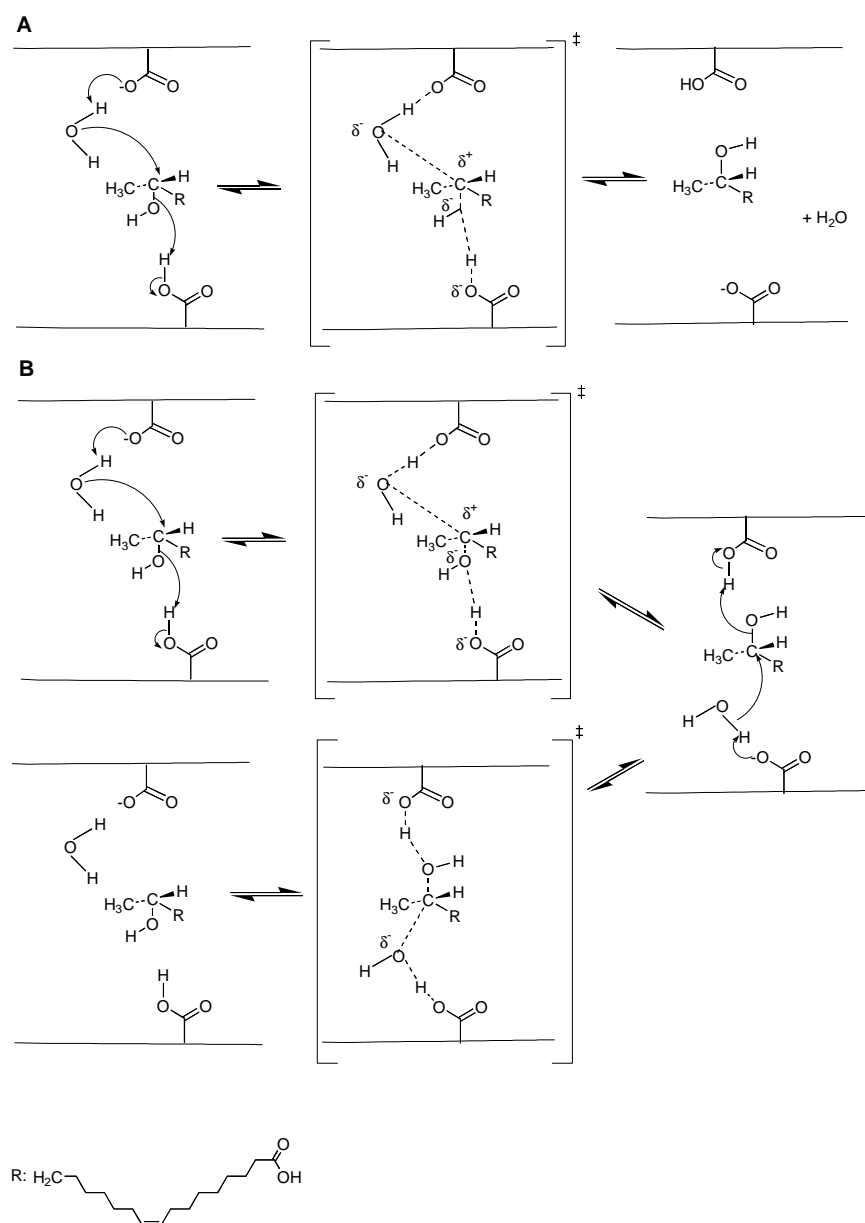


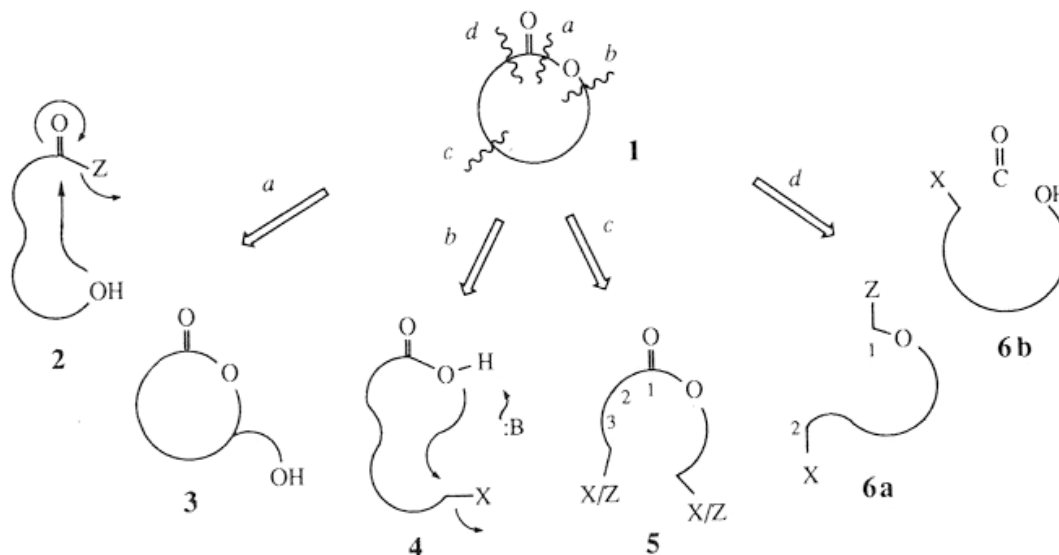
Abb. 50: Mechanismus zur Stereochemie der freigesetzten Hydroxyfettsäure. A: inverser Verlauf; B: retentiver Verlauf

4.6 Lactonisierung

4.6.1 Synthese

Einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Gewinnung von Lactonen gibt Abb. 51 wieder. Das Lacton (**1**) wird durch Spaltung an den verschiedenen Positionen *a-d* in die möglichen Ausgangsverbindungen (**2-6b**) zurückgeführt. Makrolactonisierung ist durch Ringschluss der Verbindungen **2**, **4**, **5**, **6a**, **6b** oder Translactonisierung (**3**) möglich. Beteiligt sind die reaktiven Gruppen X und Z und/oder der Base :B.

Abb. 51: Retrosynthetische Methoden zur Lactonisierung [126] mit X und Z als reaktive



Gruppen und :B als Base.

Zu den oben abgebildeten, überwiegend chemischen Reaktionen seien einige Reviews von Lukacs [126], Masamune et al. [127], Paterson et al. [128], Boeckman et al. [129] und Nicolaou [130] genannt.

In der vorliegenden Arbeit dient die gewonnene Hydroxy-Ölsäure als Ausgangsverbindung zur Herstellung eines Makrolactons. Dieses entspricht dem Reaktionsweg **2a** in Abb. 51. Es handelt sich hierbei um eine intramolekulare Veresterung. Diese steht in Konkurrenz zur intermolekularen Reaktion, die zur Dimerisie-

rung, Trimerisierung oder Polymerisierung führt. Aus den gebildeten offenen Dimeren entstehen als Folgeprodukte die cyclischen Derivate [131]. Makrolactonisierungen sind aus oben genannten Gründen chemisch nur schwierig darzustellen und benötigen hohe Verdünnungen des Substrates, um Oligomerisierung zu vermeiden [132]. Oftmals reicht auch die Reaktivität der Carboxylgruppe allein nicht aus, so dass sie unter milden Bedingungen in eine reaktivere Form überführt werden muss [133], [134]. Unter der Verwendung von Biokatalysatoren wie Lipasen kann auf eine Aktivierung der Carboxylgruppe verzichtet werden. Bis heute ist nicht geklärt, warum Lipasen die Makrolactonisierung der Oligomerisierung vorziehen. Eine Möglichkeit ist die hydrophobe Bindungstasche, in der die gefaltete Form der monomeren Hydroxysäure bevorzugt wird [132], [135]. In Abb. 52 ist die Form der hydrophoben Bindungsregion der Lipase aus *Candida antarctica* wiedergegeben. Die längste unverzweigte Fettsäure, die in der trichterförmigen Tasche aufgenommen werden kann, besitzt 13 Kohlenstoffatome [136]. Die Hydroxyfettsäure beinhaltet sowohl die Carboxylgruppe als auch die Hydroxygruppe. Zur Zyklisierung ist eine Faltung der Fettsäure erforderlich. Werden beide Gruppen am reaktiven Zentrum des Enzyms gebunden, so tauchen an jeder Seite der hydrophoben Tasche höchstens acht bis neun Kohlenstoffatome ein. Diese Anordnung wird durch die unpolare Umgebung stabilisiert. Bei einer intermolekularen Veresterung von zwei Hydroxy-Ölsäuren ist die maximale Kettenlänge überschritten. In jeder Seite der hydrophoben Tasche können statt der vorhandenen 18 C-Atome nur 13 C-Atome eintauchen.

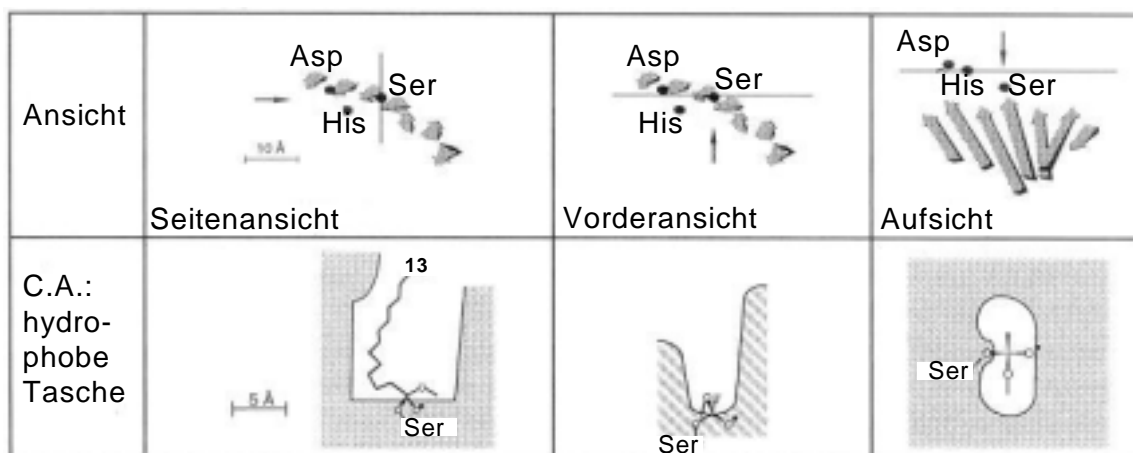


Abb. 52: Die Form der hydrophoben Bindungsregion der Lipase aus *Candida antarctica* (C.A.) in Seiten-, Vorder- und Aufsicht 2-dimensional dargestellt. Die gerade Linie zeigt die Schnittebene senkrecht zur Papierebene. Die Blickrichtung wird durch den Pfeil wiedergegeben. Die Nummer gibt die Länge der längsten Fettsäure wieder, die komplett innerhalb der hydrophoben Bindungstasche gebunden werden kann [136].

Da schon Guo und Sih 1988 [137] berichteten, dass die freie Form der Hydroxy-Fettsäure gegenüber ihrem Methylester zu größeren Ausbeuten an Lacton führte, wurde auch in der vorliegenden Arbeit mit der freien Form gearbeitet. Ein weiterer Vorteil ist auch der so eingesparte Syntheseschritt zur Methylierung. In der Literatur zur enzymatischen Lactonisierung wurde bislang nur über Lipase-katalysierte Reaktionen berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auch eine Synthese mittels einer auf Eupergit immobilisierten Esterase aus Schweineleber mit einem Umsatz von rund 60% erreicht.

Als Lösemittel wurde ein unpolares Lösemittel (Cyclohexan) gewählt, in dem die Hydroxy-Ölsäure gut löslich war. In der Literatur wurden mittels immobilisierter Lipase aus *Candida antarctica* hohe Ausbeuten an Hexadecanolid in unpolaren aromatischen Lösemitteln wie Toluol (85%), Benzol (87%) und chlorierten Verbindungen wie Dichlormethan (98%) und Chloroform (89%) erhalten. Mit Cyclohexan dagegen wurden keine [138] oder nur geringe Ausbeuten von 26% [139] erreicht. Aus Gründen des Umweltschutzes wurde bei den Umsetzungen jedoch weitestgehend auf den Einsatz von chlorierten und aromatischen Lösemitteln verzichtet, und mit Gemischen von Cyclohexan/Ethylacetat oder Cyclohexan allein gearbeitet. Ethylacetat ist jedoch als polares Lösemittel für eine Lactonisierung ungeeig-

net [141], da hier Transversesterungen als Nebenreaktion auftreten. Es wurde deshalb mit dem unpolaren Lösemittel Cyclohexan gearbeitet, bei dem in der Literatur mit Lipase aus *Pseudomonas sp.* Ausbeuten von 79% bei einer Temperatur von 40°C erzielt wurden [141].

Die Versuche im g-Maßstab wurden bei einer Temperatur von 50°C (weitestgehende Vermeidung von Dimerisierung) durchgeführt, und es wurde bereits nach 6 h das Lacton detektiert. Eine nahezu vollständige Umsetzung wurde jedoch erst nach 12 d beobachtet. Bei dem Zwischenprodukt handelte es sich wahrscheinlich um ein Oligomer [141], das unterhalb von 45°C verstärkt gebildet wird, darüber jedoch nur in geringem Ausmaß zu finden ist [132]. Im Laufe der Reaktion wurde dieses wahrscheinlich wieder hydrolysiert und das monomere Lacton daraus synthetisiert.

Neben der Temperatur und dem Lösemittel ist auch die Konzentration der Hydroxy-Ölsäure entscheidend. Die meisten Reaktionen, die unterhalb von 45°C durchgeführt wurden, arbeiteten mit Konzentrationen im „high dilution“-Bereich von 1-10 mM [139], [141], [138]. Bei höheren Substratkonzentrationen von 10 mM und 100 mM führten Koder et al. [142] die Lactonisierung mit einer Polyethylenglykol derivatisierten Lipase aus *Pseudomonas cepacia* durch. Es wurde eine drastische Abnahme der Produktbildung von 48% (10 mM) auf 11% (100 mM) bei erhöhter Substratkonzentration beobachtet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche besaßen eine Substratkonzentration von 20 mM. Wie in Abb. 34, S. 66 zu sehen ist, wurde eine nahezu vollständige Umsetzung von über 90% erreicht.

Der Umsatz der Hydroxy-Ölsäure zum Lacton weist eine hohe Diskrepanz zwischen freier (90%) und immobilisierter (50%) Lipase aus *Candida antarctica* auf. Diese ist wahrscheinlich auf eine niedrigere Wiederfindungsrate des Produktes der C.A._{imm} zurückzuführen. Die Gründe dafür sind in der makroporösen Struktur des Trägermaterials der immobilisierten Lipase zu suchen. Das Produkt lagerte sich wahrscheinlich dort ein oder wurde adsorbiert. Diese Annahme konnte bei Versuchen zur Lactonisierung der epoxidierten Hydroxy-Ölsäure bestätigt werden.

Durch Extraktion der immobilisierten Lipase mit Dichlormethan konnte zusätzliches Makrolacton gewonnen werden.

Nach der Hydrolyse der SLS-DEAC mittels Naringinase lag die Hydroxy-Ölsäure mit einem Enantiomerenüberschuss von >90% vor. Die Versuche zur Stereoselektivität wurden also mit einem Enantiomerengemisch aus *L*- und *D*-(ω -1)-OH-Fettsäure durchgeführt. Theoretisch bieten sich für jedes Isomer zwei Möglichkeiten zum Ringschluss. Daraus resultieren vier Stereoisomere (FS-1=> Lac-1a/Lac-1b und FS-2 =>Lac-2a/Lac-2b) (Kapitel 3.6, S. 64, Abb. 32). Es wurden jedoch lediglich drei Isomere detektiert. Dieses ist sicherlich mit dem hohen Enantiomerenüberschuss an FS-1 zu erklären. Die Komponente Lac-2b wurde in so geringen Mengen gebildet, dass sie unter die Nachweisgrenze fiel. Das Enantiomer zu Lac-2b ist Lac-2a, dessen Wert unter 20% lag. Beide Enantiomere wurden wahrscheinlich aus der Unterschusskomponente FS-2 zyklisiert.

Die Lipase aus *Rhizopus niveus* und Lipase aus *Rhizopus dalamar* katalysierten keine monomere Lactonbildung. Im Falle der letzteren Lipase wurde dieses auch von Makita et al. [141] beobachtet. Die immobilisierten Enzyme Esterase aus Schweineleber und Lipase aus *Candida antarctica* (C.A._{imm}) synthetisierten mit 50 und 70% überwiegend Lac-1a. Die Lipase aus Schweinemagen, die Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* und die Lipase aus *Candida antarctica* bilden mit 65-70% überwiegend Lac-1b. Hervorzuheben ist eine Umkehr der Stereospezifität bei der Lipase aus *Candida antarctica*, die als freie bevorzugt Form Lac-1b und als immobilisierte Form Lac-1a bildete. Von Lobell und Schneider wurde von einer Bevorzugung des (*R*)-Enantiomers bei der Makrolactonisierung [143] und der Bildung des Dilactones [137] berichtet. Als Ausgangssubstanz diente ein Hydroxycarbonsäurevinylester, der mittels der immobilisierten Lipase aus *Pseudomonas* sp. zyklisiert wurde. Das empirisch gewonnene Erklärungsmodell zur Enantioselektivität enzymatischer Veresterung sekundärer Alkohole kann bei Lactonen nicht angewendet werden, da das Stereozentrum in unterschiedlicher Position vorliegt. Acyclische Ester nehmen eine *syn* Konformation entlang der Carbonyl C-Alkohol-O-Bindung ein. Die Ringbindung erfordert jedoch eine *anti*-Orientierung des Carbonylsauerstoffs und des Stereozentrums [132].

4.6.2 Mechanismus der enzymatischen Lactonbildung

Lipasen katalysieren sowohl die Esterbildung als auch deren Hydrolyse. Die erste Reaktion erfolgt bevorzugt unter Abwesenheit von Wasser in organischen Medien. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Reaktion unter Beteiligung von drei charakteristischen Proteinseitenketten stattfindet [144], [145]. Die drei an der Katalyse beteiligten Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure werden auch als katalytische Triade bezeichnet. Serin und die Asparaginsäure sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Protonen des Imidazolringes des Histidins verbunden. Der Mechanismus zur Lactonisierung wurde dem der Lipase-katalysierten Esterhydrolyse [146], [147] entsprechend modifiziert. Die Reaktion startet mit einem nucleophilen Angriff des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff der Fettsäure. Der daraus resultierende tetraedrische Übergangszustand folgt einer Umhybridisierung des C-Atoms von sp^2 (trigonal planar) in sp^3 (tetraedrisch). Dabei wird eine negative Ladung am Sauerstoffatom der Carbonylgruppe (Oxyanion) erzeugt, die durch H-Brücken der Aminosäuren des *oxyanion holes* stabilisiert werden. Außerdem erfolgt ein Protonentransfer vom Serin zum Histidin. Diese Protonen-Übertragung wird durch die katalytische Triade wesentlich beeinflusst. Das Aspartat bringt den Imidazolring des Histidins in die richtige Position und neutralisiert partiell dessen im Übergangszustand erhaltene positive Ladung. Von der protonierten Form des Histidins wird das Proton auf die OH-Gruppe übertragen. Dies bewirkt die Abspaltung von Wasser. Im nächsten Schritt greift das Sauerstoffatom der (ω -1)-Hydroxylgruppe der Fettsäure intramolekular den Carbonylkohlenstoff an, und es bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem protonierten Histidin und dem Sauerstoff aus (zweiter tetraedrischer Übergangszustand). Im letzten Schritt erfolgt eine erneute Umhybridisierung von Oxyanion zum Carbonylsauerstoff. Ein erneuter Protonentransfer vom Histidin zum Sauerstoffatom des Serins bewirkt eine Freisetzung des gebildeten Lactons.

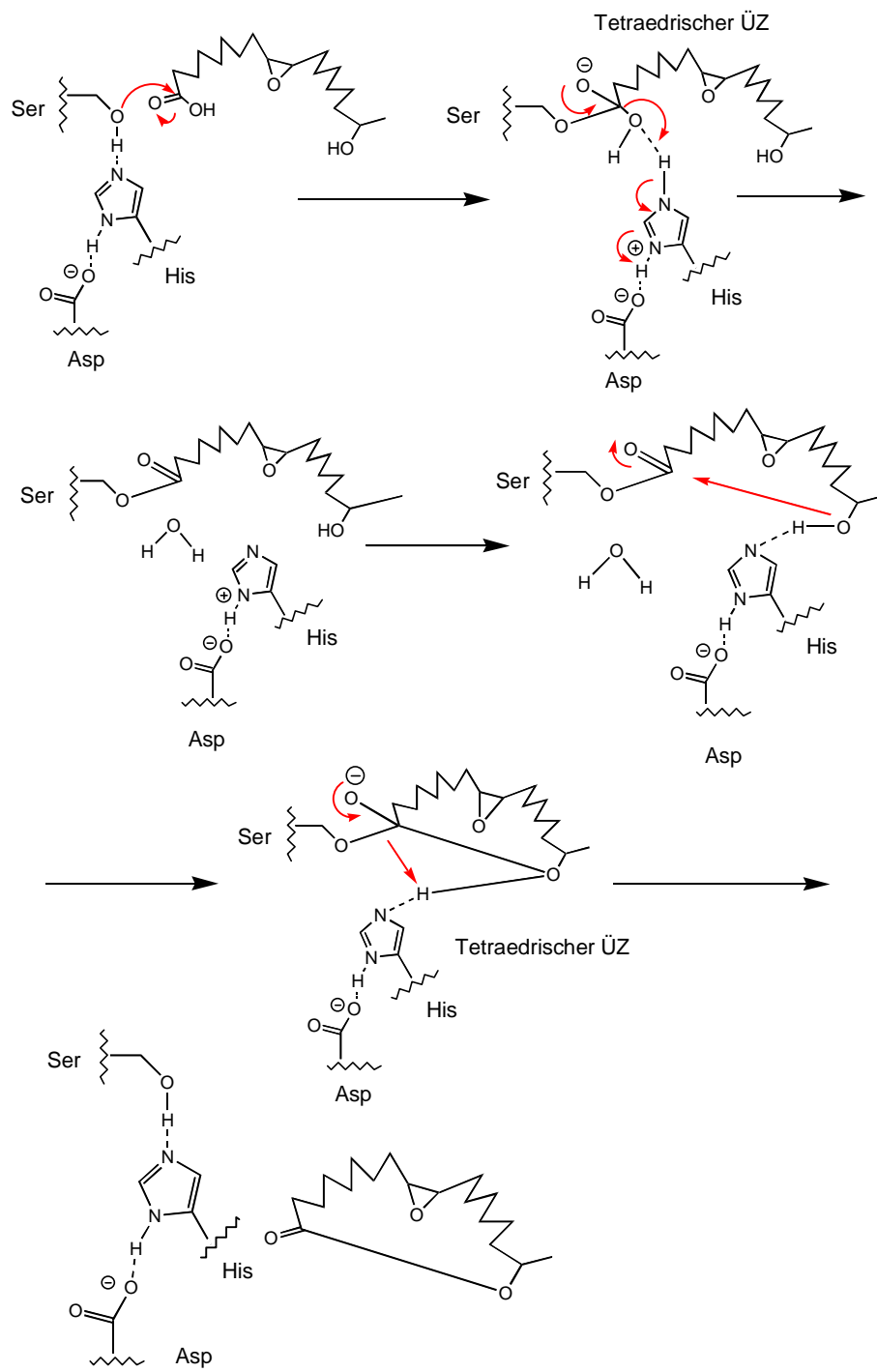


Abb. 53: Mechanismus der Lipase-katalysierten Lactonisierung (H-Brücken gestrichelt)

4.7 Epoxidierung

Die Epoxidierung von Doppelbindungen mittels enzymatischer Methoden bietet die Möglichkeit zur Synthese enantiomerenreiner Epoxide, da die Doppelbindung eine prostereogene Einheit darstellt [148]. Chirale Epoxide werden intensiv angewandt als hoch wertvolle Intermediate in der Herstellung chiraler Verbindungen. Sie besitzen die Fähigkeit, mit einem breiten Spektrum an Nucleophilen zu reagieren [79]. Epoxide finden in der Industrie Anwendung als Epoxidharze, Tenside, Farben, Klebstoffe, Oberflächenversiegelungen und bioaktive Substanzen [149], [150]. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Produktionsverfahren entwickelt [151], [152].

4.7.1 Reaktionsbedingungen

Die enantioselektive Epoxidierung von aktivierten Doppelbindungen wie den Allylalkoholen liefert nach der Katsuki-Sharpless Methode [153] hervorragende Ergebnisse. Bei nicht aktiven Doppelbindungen wird der Einsatz von (Übergangs-) metallorganischen Komplexen [154], [155] oder Persäuren [156], [157] notwendig. Desweiteren wurden zur Epoxidierung von ungesättigten Fettsäuren und deren Derivaten Dioxirane eingesetzt [158]. Neben diesen rein chemischen Methoden sind auch eine Reihe von Peroxidasen in der Lage, Substrate mit Doppelbindungen zu epoxidieren. Meist nutzen sie Wasserstoffperoxid oder organische Hydroperoxide als Cosubstrat. Ihre Anwendung für die Synthese ist aber von untergeordneter Bedeutung [159]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Merrettichperoxidase ergab in diesem Zusammenhang keine Epoxidierung von SLS-DEAC 18:1, FS und methylierter FS.

Eine weitere Möglichkeit, Epoxide im industriellen Maßstab herzustellen, bietet die chemoenzymatische Epoxidation mittels Lipasen und Wasserstoffperoxid. Dieses Verfahren wurde erstmals entdeckt und patentiert von Novo Nordisk DK [160], [49], [161], [162]. Weitere Publikationen folgten durch die Arbeitsgruppe Warwel [50], [163], [164].

Auch wenn einige Percarbonsäuren kommerziell erhältlich sind, so besitzen sie aufgrund ihres hohen Preises und der Explosionsgefahr nur eine limitierte großtechnische Nutzung [49]. Die chemische Synthese der Persäuren wird aufgrund ihrer schwierigen Handhabung oftmals in-situ vorgenommen. Die notwendigen starken Mineralsäuren führen aber zu unerwünschten Nebenprodukten wie Diolen, Hydroxyestern, Diloiden und anderen Dimeren [50], [165]. Bei der chemoenzymatische Epoxidierung wurde die Mineralsäure durch eine Lipase ersetzt. Als besonders geeignet hat sich die auf einem Polyacrylatharz immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* (C.A._{imm}) erwiesen [160], [161], [49]. Sie zeigte nach 15 Reaktionszyklen noch rund 60% ihrer Anfangsaktivität auf [164].

Als Lösemittel wurden Toluol [164], [163], [50], [166], [49], Butylsäureethylester [167], Kohlensäurediester [165], Carbonsäureester [50], Hexan [49] und Acetonitril [49] verwendet. Desweiteren wurden als mögliche Lösemittel Cyclohexan, Heptan, Benzol, DCM, Dimethylformamid, Dioxan, Tetrahydrofuran und wässrige Pufferlösungen angegeben. Bevorzugt wird das Lösemittel verwendet, in dem Substrat und Produkt gut löslich sind und in dem das Enzym eine gute Aktivität und Stabilität aufweist [49].

Die besten Ergebnisse wurden bei freien Carbonsäuren mit 60%iger Wasserstoffperoxidlösung erzielt [161], [166]. Diese ist aber kommerziell schwer erhältlich. Deshalb und aus Gründen der Sicherheit wurden im Rahmen dieser Arbeit die Versuche mit 35%iger Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt. Aus der Literatur ist z.B. die Umsetzung von Octansäure in Hexan mit 30%iger Wasserstoffperoxidlösung bekannt [49]. Eine Umsetzung von FS und Lac/FS wurde weder in Toluol, MTBE noch in Cyclohexan beobachtet. Auch die methylierte FS, die bei Rüschen, Klaas und Warwel [50] durch Perhydrolyse zur Persäure umgewandelt wurde, zeigte keine Epoxidbildung. Erst der Einsatz von DCM, einem aprotischen, nicht basischen Lösemittel mit hoher Polarität, führte zu einer Epoxidierung der (ω -1)-OH-Fettsäure.

Im Folgenden werden die Reaktionsbedingungen zur chemischen Epoxidierung mittels Persäuren zusammengefasst, da der zweite Schritt der chemoenzymatischen Epoxidation, bei der die Sauerstoffübertragung von der Persäure auf die Doppelbindung ohne Enzym erfolgt, chemisch stattfindet [164].

1. Der Umsatz von Alkenen mit organischen Persäuren zu 1,2-Epoxiden ist als *Prileschajew-Reaktion* bekannt.
2. In acyclischen Alkenen sind *cis*-C=C-Doppelbindungen reaktiver als *trans*-Doppelbindungen.
3. Kinetische Untersuchungen zur Epoxidierung von aliphatischen Alkenen mit Peressigsäure ergaben eine steigende Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substitution.[51],[168]. Die ausgeprägte Reaktivitätsabstufung alkylierter Alkene erlaubt die regioselektive Epoxygenierung der stärker substituierten C=C-Doppelbindungen in nicht konjugierten Polyenen [169].
4. Elektronenziehende Substituenten setzen die Reaktionsgeschwindigkeit herab. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt, wenn diese Substituenten direkt am sp^2 -Kohlenstoffatom gebunden sind. Entsprechend erfordern α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen zur Epoxygenierung Percarbonsäuren von besonders ausgeprägter Oxidationskraft [170]
5. Die Epoxidbildung erfolgt nach konzertiertem Mechanismus, wobei die Ausbildung des Übergangszustandes durch die Geometrie der organischen Persäuren (intramolekulare H-Brücke) unterstützt wird.[171]. Dieser Mechanismus erklärt u. a. die streng stereospezifische *cis*-Addition: *cis*-Alkene ergeben *cis*-Oxirane; *trans*- Alkene ergeben *trans*-Oxirane. [171], [170].

6. Die Geschwindigkeit und Ausbeute von Epoxidierung werden sehr erheblich durch die verwendeten Percarbonsäuren [51] und das Lösungsmittel [51] beeinflusst. Die Reaktivität von Percarbonsäuren steigt annähernd mit der Acidität der zugehörigen Carbonsäuren. So sind Trifluorperessigsäure, 3-Chlor- und 4-Nitro-perbenzoesäure wesentlich reaktiver als die zugehörigen unsubstituierten Persäuren. Andererseits fördert eine zu hohe Acidität der entstehenden Carbonsäure eine unerwünschte Oxiranspaltung. Neben der Reaktivität der Percarbonsäuren spielen auch deren Zugänglichkeit und Stabilität (bei längerer Reaktionsdauer) eine Rolle [170].
7. Als Lösemittel sind vor allem aprotische, nicht basische Lösemittel hoher Polarität [172], d.h. Dichlormethan, Chloroform, Chlorbenzol, 1,2-Dichlorbenzol od. Dichlorethan, [170], [51], [173] geeignet. Mit sinkender Polarität sinkt i.a. die Reaktionsgeschwindigkeit. Wenig geeignete basische Lösemittel sind z.B. Ether, Ester und Alkohole insbes. tert.-Butanol.

4.7.2 Mechanismus der chemoenzymatischen Epoxidation

Die Vorteile gegenüber der chemischen Epoxidierung zeigen sich im Mechanismus der chemoenzymatischen Reaktion. Die Persäurebildung erfolgt in-situ durch Sauerstoffübertragung des Enzyms (Abb. 54 Gleichung 1 und 3). Der nächste Schritt erfolgt chemisch.

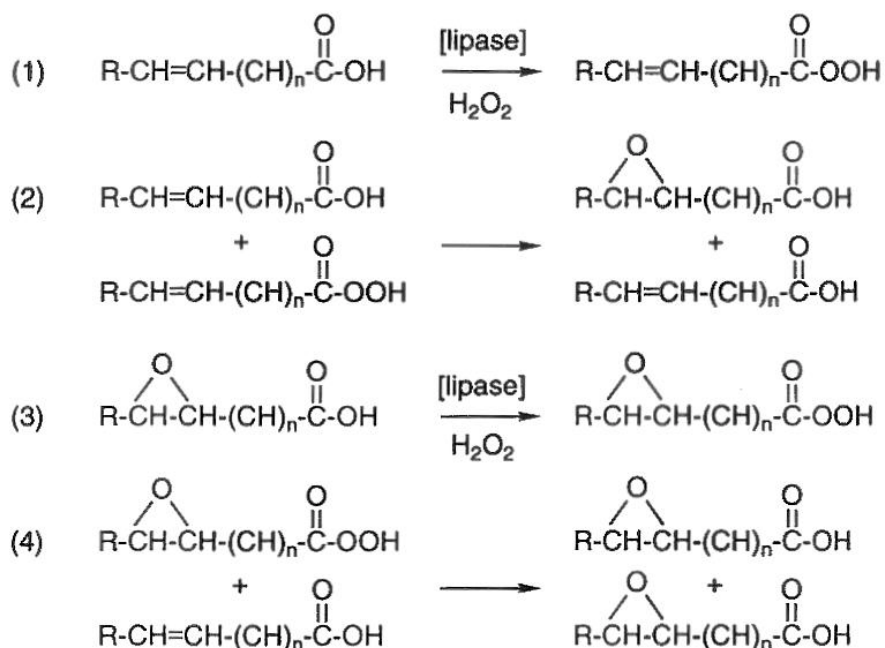


Abb. 54: Mechanismus der chemoenzymatischen Epoxidierung [164]

Die Persäure überträgt das Sauerstoffatom in einem konzertierten Mechanismus auf die Doppelbindung [171] (Abb. 54 Gleichung 2 und 4). Die so frei werdende Carbonsäure steht der Lipase für einen erneuten Zyklus zur Verfügung. Die Persäure und das Enzym werden somit nur in katalytischen Mengen benötigt. Dieser Aspekt ist für die industrielle Anwendung von entscheidender Bedeutung. So reduziert sie einerseits Kosten und die milden Bedingungen gewährleisten andererseits eine höhere Sicherheit. So wurden mit 200 mg Enzym 40 g der 9,10 Epoxystearinsäure hergestellt [164].

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, kann bei geeigneter Wahl des Lösungsmittels mit kommerziellem 35%-igen Wasserstoffperoxid gearbeitet werden. Dieses verlängert zudem gegenüber einer 60%-igen Lösung (sehr starke Oxidationskraft) die Lebensdauer des Enzyms. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Nach vollständiger Epoxidierung der eingesetzten Fettsäure (Kontrolle mittels DC) wurde das Enzym durch Filtration zurückgewonnen. Die Entfernung von überschüssigen Peroxiden erfolgte durch mehrmali-

ges Extrahieren mit destilliertem Wasser. Die Überprüfung der Peroxidkonzentration gelang durch einen einfachen Stäbchentest.

In Abb. 54 ist der Mechanismus für die intermolekulare Übertragung von Sauerstoff abgebildet. Es ist jedoch auch ein intramolekularer Verlauf bei hoher Verdünnung denkbar.

4.8 Pharmazeutische Tests

Schon 1986 wurden von Ikeda *et al.* [8] Toxizitätsstudien an Ratten mit der deacetylierten Sophoroselipid-Säure durchgeführt. Dabei blieb eine Dosis von 53 mg/kg/d ohne Wirkung und eine Dosis von 208 mg/kg/d ohne toxische Wirkung. SL besitzen aufgrund ihrer amphiphilen Struktur eine antimikrobielle Wirkung [20].

Vielversprechende Ergebnisse lieferten Untersuchungen von SL und deren Derivaten als Anti-Krebs-Mittel. Es wurde eine in-vitro Aktivität gegen Leukämie [26], [174] und Kopf/Nacken-Tumorzelllinien [26] festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden SLS-DEAC 18:1, FS, Lac und Glu-LS auf ihre biologische Aktivität bezüglich der Tumorzelllinien HMO2 (Magenkarzinom) und Hep G2 (Leberkarzinom) getestet. FS und Glu-LS zeigten eine viel versprechende zytotoxische Wirkung, konnten jedoch das Zellwachstum nicht vollständig hemmen. Weitere Modifikationen der Substanzen könnten vielleicht zukünftig zu einem verbesserten Ergebnis führen.

4.9 Spektroskopische Daten

Im folgenden werden einige Besonderheiten diskutiert, wie z.B. die cis oder trans Stellung der Doppelbindung und die Unterscheidung von Säure und Lacton mittels C^{13} -NMR. Die spezifische Zuordnung der einzelnen Daten erfolgte bereits im Ergebnisteil.

Tulloch *et al.* ermittelten NMR-Daten regioisomerer Hydroxy-Stearate [175]. Die CH-OH-Gruppe hat dabei einen merklichen Einfluss auf die Kohlenstoffatome in der unmittelbaren Umgebung. Die Werte für die CH₂-Gruppen (in Position α - ξ) verschieben sich ausgehend von einem Mittelwert von 29,9 ppm für Carbonsäuren [176], [177] und 29,84 ppm für Ester [176] (Tab. 22).

Tab. 22 Einfluss der OH-Gruppe auf die chemische Verschiebung (alle Angaben in ppm) benachbarter C-Atome

	OH	α	β	γ	δ	ϵ	ξ
[175]	+42,2	+7,8	-4,0	+0,06	-0,06	-0,09	-0,05
FS	+38,7	+10,2(C16)	-3,1(C15)	keine spezifische Zuordnung der C-Atome			
FS-ep	+38,9	+10,2(C16)	-3,4(C15)	keine spezifische Zuordnung der C-Atome			

Die chemische Verschiebung von 130,8/130,9 ppm für die FS und 130,1/130,2 ppm für das Lac ist ein eindeutiger Hinweis auf eine Doppelbindung [178], [176]. Durch den Nachbargruppeneffekt lässt sich zwischen einer *cis* (α -C:-2,5) oder *trans* (α -C:+2,9) Doppelbindung unterscheiden [179]. Die C-8 und C-11-Atome weisen im Vergleich zur „unbeeinflussten“ CH₂-Gruppe einen Differenzwert von – 1,6 (FS) und –2,6 (Lac) auf. Dies ist ein Hinweis auf eine *cis*-Doppelbindung.

Die Unterscheidung von Carbonsäure und Lacton gelingt durch den Vergleich der entsprechenden chemischen Verschiebungen der C-1-Atome der jeweiligen Verbindungen. So weisen die beiden Carbonsäuren Werte von 178,2 ppm (FS) bzw. 179,0 ppm (FS-ep) auf. Für die entsprechenden Lactone wurden dagegen mit 173,7 ppm (Lac) bzw. 175,5 ppm (Lep) wesentlich geringere Werte detektiert, die mit den Werten der Methylester vergleichbar sind [176]. Des weiteren stimmt der Wert des 18-gliedrigen Lac (173,7 ppm) sehr gut mit dem Wert des Pentandecenolids mit 173,9 ppm überein [180].

C-13 NMR Untersuchungen zu Epoxysäuren wurden von Bascetta und Gunstone und Lie Ken Jie [181] [182] durchgeführt. Dort sind unter anderem chemische

Verschiebungen von *cis* und *trans* 3,4 bis 17,18-Epoxyoctadecanester angegeben. Im allgemeinen besitzen die Epoxid-Kohlenstoffatome chemische Verschiebungen von 56,9 (*cis*) bis 58,5 ppm (*trans*). Aufgrund von long-range Kopplungen oder einer omega Methylfunktion können auch zwei Signale auftreten, wie sie bei dem Lep (58,7 und 58,6 ppm) zu beobachten sind. Bei FS-ep tritt dagegen nur ein Signal bei 57,8 ppm auf. Aufgrund seiner Verschiebung, die zwischen den Werten für *cis* oder *trans* liegt, kann hier nicht entschieden werden, ob es sich um ein *trans* oder *cis* 1,2-Epoxid handelt. Dagegen weist das aus der epoxidierten FS-ep synthetisierte Lacton mit einem Wert von 58,7 bzw. 58,6 ppm eher auf ein *trans* Epoxid hin. Andererseits widerspricht das dem konzertierten Reaktionsmechanismus der Epoxigenierung durch Persäuren, wonach aus einer *cis*-Verbindung auch ein *cis*-Epoxid entsteht [171]. Möglicherweise ist der höhere Wert auch durch die Ringstruktur erklärbar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der chemoenzymatischen Modifikation von nativen und hydrolysierten Sophoroselipiden. Ausgangsmaterial lieferte eine Batch-Kultivierung der Hefe *Candida bombicola* auf Rapsöl und Glukose.

Durch alkalische Hydrolyse wurde das native Sophoroselipid-Gemisch in die einheitliche Säureform überführt. Die Hauptkomponente (>80%) der so erhaltenen deacetylierten Sophoroselipide besitzt eine optisch aktive 17-L-Hydroxy-Ölsäure. Mittels MPLC gelang es, dieses Sophoroselipid zu isolieren und dessen Enantiomerenreinheit von >99% über chiraler DC nachzuweisen.

Die so gewonnene Verbindung diene als Baustein für die Generierung eines chiralen Pools und ist besonders interessant für biomedizinische Zwecke. Durch chemische und enzymatische Umsetzungen mittels Glukosidasen und Lipasen wurden weitere Folgeprodukte erhalten.

Für die Herstellung der Glukoselipid-Säure aus Sophoroselipid-Säure mit Naringinase aus *Penicillium decumbens* wurden die kinetischen Parameter mit $v(\max) = 3.942 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L} \cdot \text{s}$ für Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante mit $K_m = 6.983 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ bestimmt.

Die Freisetzung der 17-L-Hydroxy-Ölsäure gelang sowohl durch chemische Hydrolyse mit Salzsäure in Dioxan, als auch mit verschiedenen β -Glukosidasen in einem Phosphatpuffer. Nachteil der chemischen Umsetzung ist mit 28,5% die geringe Enantiomerenreinheit.

Die Spezifität der Reaktion konnte durch den Einsatz von Enzymen erheblich gesteigert werden. Unter den verwendeten Glukosidasen reagierten nur diejenigen, die eine β -Aktivität aufwiesen und dem Clan GH-A angehörten. Eine endo-Aktivität der Enzyme, bei der die Sophorose freigesetzt wird, wurde nicht beobachtet. Der Umsatz und die Enantiomerenreinheit wurde durch die Variation des pH-Wertes und der Temperatur optimiert. Durch den Einsatz der Glukosidase

Naringinase aus *Penicillium decumbens* gelang es, 80% der (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure mit einer Enantiomerenreinheit von 95% freizusetzen.

Die Synthese des Lactons der (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure gelang unter drastischen Bedingungen in einer „Eintopf-Reaktion“ durch die Umsetzung von Sophorolipid-Säure mittels konzentrierter Schwefelsäure. Eine größere Ausbeute und Spezifität lieferte jedoch die Lactonisierung der 20 mM (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure in Cyclohexan mittels verschiedener Lipasen. Die höchsten Umsätze mit 89 % wurden dabei mit der freien Lipase aus *Candida antarctica* erzielt. Die Stereochemie ließ sich durch die Verwendung der immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym 435) umkehren. Novozym 435 lieferte drei Stereoisomere der prozentualen Zusammensetzung: 67/25/7. Ansätze im g-Maßstab lieferten 800 mg des Lactons.

Die chemoenzymatische Epoxidierung der (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure (FS) gelang mit 35%-iger Wasserstoffperoxidlösung und der Lipase Novozym 435 in Dichlormethan. Die Enantiomerenreinheit lag bei 81%. Die methylierte (Me-FS) und die zyklisierte (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure (Lac) wurden unter den gewählten Bedingungen nicht epoxidiert. Die Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC) wurde während der Reaktion hydrolysiert und die freigesetzte Fettsäure (FS) epoxidiert.

Das epoxidierte Lacton (Lac) wurde durch eine enzymatische Zyklisierung der epoxidierten (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure (FS-ep) mittels der immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica* erhalten.

Die Sophoroselipid-Säure (SLS-DEAC 18:1), die Glucoselipid-Säure (Glu-LS), die (ω -1)-Hydroxy-Fettsäure (FS) und das Lacton (Lac) wurden hinsichtlich ihrer Hemmung gegenüber Tumorzelllinien aus Magen- und Leberkarzinom getestet. Unter den untersuchten Substanzen zeigten Glu-LS und FS ein viel versprechendes Ergebnis: das Zellwachstum konnte um 80-90% gehemmt werden.

6. Literaturhinweise

1. Lang, S., Wagner, F. (1995), *Mikrobielle und enzymatische Synthese von Biotensiden auf der Basis nachwachsender Rohstoffe*, Fat Sci. Technol., **97**, 69-78.
2. Fiechter, A. (1992), *Biosurfactants: moving towards industrial application*, Tibtech, **10**, 208-271.
3. Hommel, R.K. (1990), *Formation and physiological role of biosurfactant produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms*, Biodegradation, **1**, 107-119.
4. <http://www.soliance.com> Produktinformation: Sopholiance - antibacterial and antiacne natural ingredient, in *Soliance -The formulator's choice for active, natural ingredients*. 7.
5. Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., Gorin, P.A.J. (1967), *Oil glycosides of sophorose and fatty acid esters thereof*, US3205150,
6. Phaff, H.J., Starmer, W.T. (1989), *Yeasts associated with plants, Insects and Soil* The Yeasts (ed. Rose, A.H., Harrison, J.S.) **Vol. 1**, London, New York: Academic Press.
7. Schippers, C., Geßner, K., Müller, T., Scheper, T. (2000), *Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture*, J. Biotechnol., **83**, 189-198.
8. Ikeda, Y., Sunakawa, T., Okamoto, K., Hirayama, A. (1986), *Toxicological studies on sophorolipid derivatives-(II) subacute toxicity study of polyoxypropylene (12) [(2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy-] fatty acid ester*, The Journal of Toxicological Science, **11**, 213-224.

9. Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., Wagner, F. (1991), *Toxicity Testing of Synthetic and Biogenic Surfactants on Marine Microorganisms*, Environmental Toxicology and Water Quality, **6**, 157-163.
10. Reuss, M.k., Sylatk, C., Binder, M., Schütz, M. (1995), *Verfahren zur Herstellung von Sophoroselipiden und anderen Biotensiden auf Molkebasis*, DE19518768 A1,
11. Daniel, H.-J., Otto, R.T., Binder, M., Reuss, M., Sylatk, C. (1999), *Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates*, Appl. Biochem. Biotechnol., **51**, 40-45.
12. Hommel, R., Weber, R., Weiss, A., Himmelreich U., Rilke, O., Kleber, H.-P. (1994), *Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose*, J. Biotechnol., **47**, 147-155.
13. Lemal, J., Marchal, R., Daniel, H.-J., Sulzer, C. (1997), *Fermentative production of sophorolipid compounds*, DE4319540, FR2692593, JP6062877,
14. Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R., Wray, V., Lang, S. (2001), *Sophorolipids: A source for novel compounds*, Industrial Crops and Products, **13**, 85-92.
15. Bundesamt, S. (2002) *Pressemitteilung vom 8.August 2002: Mehr Raps und weniger Roggen auf dem Ackerland*.
16. Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P. (1961), *Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae**, Can. J. Chem., **39**, 846-855.
17. Davila, A.-M., Marchal, R., Vandecasteele, J.P. (1997), *Sophorose lipid fermentation with different substrate supply for growth and production phases*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **47**, 496-501.

18. Haferburg, D., Hommel, R., Claus, R., Kleber, H.-P. (1986), *Extracellular microbial lipids as surfactants*, Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol., **33**, 53-93.
19. Sylatk, C., Wagner, F. (1987), *Production of biosurfactants*. Surfactants Science Series, Biosurfactants and Biotechnology, **25**, 21-45.
20. Lang, S., Katiswela, E., Wagner, F. (1989), *Antimicrobial effects of biosurfactants*, Fat Sci. Technol., **91**, 363-368.
21. Abe, Y., Inoue, S., Ishida, A. (1981), *Cosmetic composition for skin and hair treatment*, US4297340,
22. Hayes, M. (1989), *Bioemulsified-containing personal care products for topical application to dermatologic conditions of the skin and scalp*, US4870010,
23. Tsutsumi, H., Kawano, J., Inoue, S. (1981), *Cosmetic composition*, US4305961,
24. Inoue, S. *Biosurfactants in cosmetic applications*. in *World conference on biotechnology for fats and oil industry*. (1988). Champaign, American Oil Chemists Society.
25. Marchal, R., Lemal, J., Sulzer, C., Davila, A.-M. (1993), *Fed batch production of sophorolipid(s) from Candida - including preculture step, giving products in acetylated acid form, useful as emulsifier e.g. in sec. oil recovery*, FR2691975,

26. Scholz, C., Metha, S., Bisht, K., Guilmanov, V., Kaplan, D., Nicolosi, R., Gross, R. (1998), *Bioactivity of extracellular glycolipids-investigation of potential anti-cancer activity of sophorolipids and sophorolipid-derivates*, Polymer Prep., **39**, 168-169.
27. Davila, A.-M., Marchal, R., Monin, N., Vandecasteele, J.P. (1993), *Identification and determination of individual Sophoroselipids in fermentation products by gradient elution high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*, J. Chromatogr., **648**, 134-149.
28. Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., Gorin, P.A.J. (1965), *Hydroxy fatty acid production*, US3205150,
29. Cooper, D.G., Paddock, D.A. (1983), *Torulopsis perophilum and surface activity*, Appl. Environ. Microbiol., **46**, 1426-1429.
30. Davila, A.-M., Marchal, R., Vandecasteele, J.P. (1992), *Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by Candida bombicola*, J. Biotechnol., **38**, 6-11.
31. Zhou, Q.H., Klekner, V., Kosaric, N. (1992), *Production of sophorose lipids by Torulopsis bombicola from safflower oil and glucose*, J. Am. Oil Chem. Soc., **69**, 89-91.
32. Lee, H.K., Kim, J.H. (1993), *Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by Torulopsis bombicola*, Biotechnol. Lett., **15**, 263-266.
33. Rau, U., Manzke, C., Wagner, F. (1996), *Influence of substrat supply on the production of sophorose lipids by Candida bombicola ATCC 22214*, Biotechnol. Lett., **18**, 149-154.
34. Lang, S., Spöckner, S., Rasch, D., Schlotterbeck, A., Rau, U. (1997), *Symposium: Chemie nachwachsender Rohstoffe, Biokonversion von Pflanzenölen*, Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie.

35. Daniel, H.-J., Otto, R.T., Reuss, M., Syldatk, C. (1998), *Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose*, Biotechnol. Lett., **20**, 805-807.
36. Casas, J.A., García-Ochoa, F. (1999), *Sophorolipid Production by Candida bombicola: Medium Composition and Culture Methods*, Journal of Bioscience and Bioengineering, **88** (5), 488-494.
37. Hu, Y., Ju, L.-K. (2001), *Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS*, Enzyme Microb. Technol., **29**, 593-601.
38. Guilmanov, V., Ballistreri, A., Impallomeni, G., Gross, R. (2002), *Oxygen Transfer Rate and Sophorose Lipid Production by Candida bombicola*, Biotechnology and Bioengineering, **77** (5), 489-494.
39. Wedler, G. (1987), *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
40. Snyder, L.R., Kirkland, J.J. (1979), *Modern Liquid Chromatography*, 2. ed, New York: Wiley.
41. Harwood, L.M. (1985), *"Dry-Column" Flash Chromatography*, Aldrichimica Acta, **18**, 25.
42. Grever, M.R., Schepartz, S.A., Chabner, B.A. (1992), *The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program*, Seminars in Oncology, **19**, 622-638.
43. Rau, U., Fiehler, K., Rasch, D., Spöckner, S., Lang, S. (1998), *Produktion und Charakterisierung von eukaryotischen Glykolipiden. In: Chemische Nutzung heimischer Pflanzenöle. Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe 12"* (ed. Rohstoffe, F.f.N.), Münster: Landwirtschaftsverlag.
44. Fiehler, K., Albrecht, A., Rasch, D., Rau, U. (1997), *Kontinuierliche Produktion von Sophoroselipiden mit Candida bombicola.*, Fett/Lipid, **99**, 19-24.

45. Inoue, S., M., Kinta, M., Kimura, S., Yoshiharu, K., Funabashi, C. (1988), *Dehydratisierendes Reinigungsverfahren von Sophoroselipiden oder einem sekundären Derivaten derselben*, DE2834118 C2,
46. Manzke, C. (2000), *Prozeßabhängige Aufarbeitung und HPLC-gestützte Analyse von Sophoroselipiden aus Candida bombicola*, Technische Universität Braunschweig, Dissertation.
47. Rau, U., Heckmann, R., Wray, V., Lang, S. (1999), *Enzymatic conversion of a sophorolipid into a glucose lipid*, Biotechnol. Lett., **21** (11), 973-977.
48. Jefford, C.W., Bernardinelli, G., Rossier, J.-C., Kohmoto, S., Boukouvalas, J. (1985), *An unusual stereospecific epoxidation with "per-Amberlyst 15"*, Tetrahedron Lett., **26** (5), 615-618.
49. Kirk, O., Björkling, F., Godtfredsen, S.E. (1991), *A Process for preparing peroxycarboxylic acids using an enzyme catalyst*, WO 91/04333,
50. Rüschen Klaas, M., Warwel S. (1999), *Complete and partial epoxidation of plant oils by lipase-catalysed perhydrolysis*, Industrial Crops and Products, **9**, 125-132.
51. Swern, D. (1971), *Organic Peroxides* (ed. Swern, D.) **Vol. 2**, New York: Wiley Interscience.
52. de Koster, C.G., Heerma, W., Pepermans, H.A.M., Groenewegen, A., Peters, H., Haverkamp (1995), *Tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of Candida bombicola sophorolipids and product formed on hydrolysis by cutinase*, J. Anal. Biochem., **230**, 135-148.
53. Prabhune, A.A., Ratledge, C. (2002), *Process for the preparation of a mixture of 19 hydroxyeicosatetraenoic acid and 20 hydroxyeicosatetracnoic acid (10 hete and 20 hete)*, US6379937,

54. Otto, R.T., Daniel, H.-J., Pekin, G., Muller-Decker, K., Furstenberger, G., Reuss, M., Syldatk, C. (1999), *Produktion of sophorolipids from whey*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **52**, 495-501.
55. Brakemeier, A., Lang, S., Wulbrandt, D., Merschel, L., Benninghoven, A., Buschmann, N., Wagner, F. (1995), *Novel Sophorose Lipids from microbial conversion of 2-Alkanols.*, Biotechnol. Lett., **17** (11), 1183-1188.
56. Klekner, V., Kosaric, N., Zhou, Q.H. (1991), *Sophoroselipids produced from sucrose*, Biotechnol. Lett., **13**, 345-348.
57. Zhou, Q.H., Kosaric, N. (1993), *Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of Torulopsis bombicola*, Biotechnol. Lett., **15**, 477-482.
58. Göbbert, U., Lang, S., Wagner, F. (1984), *Sophorose lipid formation by resting cells of Torulopsis bombicola*, Biotechnol. Lett., **6**, 225-230.
59. Davila, A.-M., Marchal, R., Vandecasteele, J.P. (1994), *Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates*, J. Ind. Microbiol., **13**, 249-257.
60. Yutaka, I., Yasuo, G., Masaru, K. (1994), *Sophorolipid derivative*, JP6100581,
61. Marchal, R., Lemal, J., Sulzer, C., Davila, A.-M. (1994), *Production of acetylated sophorolipid in acid form from substrate composed of oil or ester*, JP6062877,
62. Deshpande, M., Daniels. S. (1995), *Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by Candida bombicola using animal fat*, Bioresource Technol., **10**, 143-150.
63. Hommel, R., Kirste, S., Weber, R., Kleber, H.-P. (1992), *Verfahren zur Herstellung mikrokristalliner Glycolipide*, DD298273,

64. Stüwer, O., Hommel, R., Haferburg, D., Kleber, H.-P. (1987), *Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of Torulopsis apicola*, J. Biotechnol., **6**, 259-269.
65. Weber, R., Stach, J., Haufe, G., Hommel, R., Kleber, H.-P. (1990), *Elucidation of the structure of an unusual cyclic glycolipid from Torulopsis apicola*, Carbohydrate Research, **206**, 13-19.
66. García-Ochoa, F., Casas, J.A. (1999), *Unstructured kinetic model for sophorolipid production by Candida bombicola*, Enzyme Microb. Technol., **25**, 613-621.
67. Stüwer, O., Hommel, R., Kleber, H.-P. (1987), *Verfahren zur Herstellung kristalliner Biotenside*, DD 251992,
68. Hu, Y., Ju, L.-K. (2001), *Purification of lactonic sophorolipids by crystallization*, J. Biotechnol., **87**, 263-272.
69. Inoue, S., Kimura, S., Kinta, M. (1980), *Dehydrating purification process for a fermentation product*, US4197166,
70. Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., Gorin, P.A.J. (1969), *Yeast fermentation process*, US3445337,
71. Hommel, R., Haferburg, D., Stuber, W., Kleber, H.-P. (1986), *Verfahren zur Herstellung grenzflächenaktiver Verbindungen*, DD235461,
72. Gross, R., Guilmanov, V., Scholz, C. *Glycolipid from Torulopsis bombicola: biosynthesis, lipase-selective modification and anti-cancer activity*. in 217th ACS National Meeting. (1999).
73. Ito, S., Kinta, M., Inoue, S. (1980), *Growth of yeasts on n-alkanes: inhibition by lactonic sophorolipid produced by Torulopsis bombicola*, Agric. Biol. Chem., **44**, 2221-2223.

74. Vollbrecht, E. (1996), *Zur Analytik der wasserlöslichen anionischen Sophorolipide gebildet von der Hefe Candida bombicola ATCC 22214*, Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
75. Inoue, S., Kimura, S., Kinta, M. (1979), *Preparation of glycolipid ester*, JP54109913,
76. Steffen, B. (1994), *Lipasekatalysierte Synthese von Wachsestern und Monoglyceriden aus ungewöhnlichen Fettsäurekomponenten sowie Bestimmung ihrer Grenzflächeneigenschaften.*, Technische Universität Braunschweig, Dissertation.
77. Fink, A.L., Cartwright, S.J. (1981), *Cryoenzymology*, Crit. Rev. Biochem., **11**, 145-207.
78. Carrea, G. (1984), *Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems*, Trends Biotechnol., **2**, 102-106.
79. Faber, K. (2000), *Biotransformations in organic chemistry*, 4th ed, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
80. Bisht, K.S.G., Richard A.; Kaplan, David L. (1999), *Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Sophorolipids*, J.Org.Chem., **64** (3), 780 - 789.
81. Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. (1988), *Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids*, J. Am. Oil Chem. Soc., **65**, 1460-1466.
82. Bisht, K., Gao, W., Gross, R. (2000), *Glycolipids from Candida bombicola: Polymerization of a 6-O-Acryloyl Sophorolipid Derivative*, Macromolecules, **33**, 6208-6210.
83. Jeffcoat, R., Willis, B.J. (1988), *A Manufacturing process for hexadecanolate*, Developments in food science, **18**, 743-751.

84. Rye, C., Withers, S. (2000), *Glycosidase mechanisms*, Curr. Opin. Chem. Biol., **4** (5), 573-580.
85. Henrissat, B., Davies, G. (1997), *Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases*, Curr. Opin. Struct. Biol., **7** (5), 637-44.
86. Henrissat, B. (1998), *Glycosidase families*, Biochem. Soc. Trans., **26** (2), 153-6.
87. Coutinho, P.M., Henrissat, B. (1999), *Carbohydrate Active Enzymes*, letzte Aktualisierung: 30.11.2002, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>
88. Henrissat, B., Bairoch, A. (1996), *Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases*, Biochem J., **316**, 695-696.
89. Jenkins, J., Lo Leggio, L., Harris, G., Pickersgill, R. (1995), *Glucosidase, o-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold α/β -architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of o-strands four and seven*, FEBS Lett., **362**, 281-285.
90. Coutinho, P.M., Henrissat, B. (1999), *Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach* Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (ed. Gilbert H.J. , Davies, G., Henrissat, B., Svensson, B.), Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
91. Hase, S., Fujimura, K., Kanoh, M., Ikenaka, T. (1982), *Studies on heterogeneity of Taka-amylase A: isolation of an amylase having one N-acetylglucosamine residue as the sugar chain*, **92** (1), 265-70.
92. MacGregor, Janecek, Svensson, B. (2001), *Relationship of sequence and structure to specificity in the -amylase family of enzymes*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology, **1546** (1), 1-20.

93. Lawson, C., L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H., J., Kalk, K.H., Vries, D., Penninga, D., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W. (1994), *Nucleotide sequence and x-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 in a maltose-dependent crystal form*, J. Mol. Biol., **236**, 590-600.
94. Winterhalter, P., Skouroumounis, G.K. (1997), *Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, Role and Biotechnological Transformation*, Adv. Biochem. Biotechnol., **55**, 73-106.
95. Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E. (1985), *The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components*, J. Chromatogr., **331**, 83.
96. Haisman, D.R., Knight, D.J. (1967), Biochem J., **103**, 528.
97. Günata, Y.Z., Bitteur, S., Brillouett, J.M., Bayonove, C.L., Cordonnier, R.E. (1988), *Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape*, Carbohydr. Res., **184**, 139-149.
98. Romero, C., Manjon, A., Bastida, J., Iborra, J.L. (1985), *A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase*, Anal. Biochem., **149**, 566-571.
99. Manjon, A., Bastida, J., Romero, A., Jimeno, A., Iborra, J.L. (1985), *Immobilization of Naringinase on glycophase-coated porous glass*, Biotechnol. Lett., **7**, 477-482.
100. Koshland, D.E., Jr. (1953), *Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions*, Biol. Rev., **28**, 416-436.
101. Selwood, T., Sinnott, M.L. (1990), *A solvent-isotope-effect study of proton transfer during catalysis by Escherichia coli (lacZ) beta-galactosidase*, Biochem J., **268** (2), 317-23.

102. Rosenberg, S., Kirsch, J.F. (1981), *Oxygen-18 leaving group kinetic isotope effects on the hydrolysis of nitrophenyl glycosides. 2. Lysozyme and beta-glucosidase: Acid and alkaline hydrolysis*, Biochemistry, **20**, 3189-3196.
103. Sinnot, M.L. (1990), *Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer*, Chem. Rev., **90**, 1171-1202.
104. Legler, G. (1990), *Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors*, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, **48**, 319-84.
105. McCarter, J.D., Withers, S.G. (1994), *Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis*, Curr. Opin. Struct. Biol., **4**, 885-892.
106. Strynadka, N.C., James, M.N. (1991), *Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D*, Journal of Molecular Biology, **220** (2), 401-24.
107. Berven, L.A., Dolphin, D., Withers, S.G. (1990), *The base-catalysed anomerization of dinitrophenyl glycosides: evidence for a novel reaction mechanism*, Can. J. Chem., **68** (10), 1859-1866.
108. Tanaka, Y., Tao, W., Blanchard, J.S., Hehre, E.J. (1994), *Transition state structures for the hydrolysis of alpha-D-glucopyranosyl fluoride by retaining and inverting reactions of glycosylases*, The Journal of Biological Chemistry, **269** (51), 32306-12.
109. Ashwell, M., Guo, X., Sinnot, M.L. (1992), *Pathways for the Hydrolysis of Glycosides N-Acetylneuraminic Acid*, J. Amer. Chem. Soc., **114** (26), 10158-10166.
110. Huang, X., Tanaka, K.S.E., Bennet, A.J. (1997), *Glucosidase-Catalyzed Hydrolysis of -D-Glucopyranosyl Pyridinium Salts: Kinetic Evidence for Nucleophilic Involvement at the Glucosidation Transition State*, J. Amer. Chem. Soc., **119** (46), 11147-11154.

111. Legler, G. (1993), *Sugar analog inhibitors for glycosidases, tools for the elucidation of enzymatic hydrolysis of glycosides*, *Die Naturwissenschaften*, **80** (9), 397-409.
112. Davies, G.J., Mackenzie, L., Varrot, A., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Schulein, M., Withers, S.G. (1998), *Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining beta-glycoside hydrolase.*, *Biochemistry*, **37** (34), 11707-13.
113. Sulzenbacher, G., Mackenzie, L.F., Wilson, K.S., Withers, S.G., Dupont, C., Davies, G.J. (1999), *The Crystal Structure of a 2-Fluorocellotriosyl Complex of the Stretomyces lividans Endoglucanase CelB2 at 1.2 Å Resolution*, *Biochemistry*, **38**, 4826-4833.
114. Withers, S.G., Street, I.P. (1988), *Identification of a Covalent -D-Glucopyranosyl Enzyme Intermediate Formed on a -Glucosidase*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **110** (25), 8551-8553.
115. Withers, S.G., Warren, R.A.J., Street, I.P., Rupitz, K., Kempton, J.B., Aebersold, R. (1990), *Unequivocal Demonstration of the Involvement of a Glutamate Residue as a Nucleophile in the Mechanism of a "Retaining" Glycosidase*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **112** (15), 5887-5889.
116. McIntosh, L.P., Hand, G., Johnson, P.E., Joshi, M.D., Körner, M., Plesniak, L.A., Ziser, L., Wakarchuck, W.W., Withers, S.G. (1996), *The pKa of the general acid/base carboxyl group of a Glycosidase Cycles during catalysis: a C-13-NMR Study of Bacillus circulans Xylanase*, *Biochemistry*, **35**, 9958-9966.
117. Bruice, T.C., Kahn, K. (2000), *Computational enzymology*, *Curr. Opin. Biol.*, **4**, 540-544.
118. Lewis, B.E., Schramm, V.L. (2001), *Conformational equilibrium isotope effects in glucose by 13C NMR spectroscopy and computational studies*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **123**, 1327-1336.

119. Withers, S.G., Rupitz, K., Trimbur, D., Warren, R.A. (1992), *Mechanistic consequences of mutation of the active site nucleophile Glu 358 in Agrobacterium beta-glucosidase*, Biochemistry, **31** (41), 9979-85.
120. MacLeod, A.M., Tull, D., Rupitz, K., Warren, R.A., Withers, S.G. (1996), *Mechanistic consequences of mutation of active site carboxylates in a retaining beta-1,4-glycanase from Cellulomonas fimi*, Biochemistry, **35** (40), 13165-72.
121. Lawson, S.L., Wakarchuck, W.W., Withers, S.G. (1997), *Positioning the acid/base catalyst in a Glycosidase: Studies with Bacillus circulans Xylans*, Biochemistry, **36**, 2257-2265.
122. Wang, Q., Graham, R.W., Trimbur, D., Warren, R.A.J., Withers, S.G. (1994), *Changing Enzymatic Reaction Mechanisms by Mutagenesis: Conversion of a Retaining Glucosidase to an Inverting Enzyme*, J. Amer. Chem. Soc., **116** (25), 11594-11595.
123. Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R.W., Warren, R.A., Withers, S.G. (1995), *Identification of the acid/base catalyst in Agrobacterium faecalis β -Glucosidase by kinetic Analysis of Mutants*, Biochemistry, **34**, 14554-14562.
124. Gebler, J.C., Trimbur, D.E., Warren, R.A., Aebersold, R., Namchuk, M., Withers, S.G. (1995), *Substrate-induced inactivation of a crippled β -Glucosidase Mutant: Identification of the labeled amino acid and mutagenic analysis of its role*, Biochemistry, (34), 14547-14553.
125. Rosenberg, S., Kirsch, J.F. (1981), *Oxygen-18 leaving group kinetic isotope effects on the hydrolysis of nitrophenyl glycosides. 1. beta-galactosidase-catalyzed hydrolysis*, Biochemistry, **20** (11), 3189-96.
126. Lukacs, G. (1993), *Recent progress in the chemical synthesis of antibiotics and related microbial products* (ed. Lukacs, G.) **Vol. 2**, Berlin u. a.: Springer-Verlag.

127. Masamune, S. (1984), *Macrolide antibiotics* (ed. Omura, S.), Orlando: Academic Press.
128. Paterson, I., Mansuri, M.M. (1985), *Recent developments in the total synthesis of macrolide antibiotics*, *Tetrahedron*, **41**, 3569.
129. Boeckman, R.K., Goldstein, S.W. (1988), *The total synthesis of natural products* (ed. ApSimon, J.) **Vol. 7**, New York: Wiley.
130. Nicolaou, K.C. (1976), *Tetrahedron report number 27, Synthesis of macrolides*, *Tetrahedron*, **33**, 683-710.
131. Lukacs, G. (1993), *Recent progress in the chemical synthesis of antibiotics and related microbial products* (ed. Lukacs, G.) **Vol. 2**, Berlin u. a.: Springer-Verlag.
132. Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. (1999), *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio and Stereoselective Biotransformations.*, Weinheim: Wiley-VCH.
133. Keck, G.E., Murry, J.A. (1991), *Total synthesis of Levo Colletol*, *J. Org. Chem.*, **56** (23), 6606-6611.
134. Matsushita, M., Yoshida, M., Zhang, Y., Mijashita, M., Irie, H., Ueno, T., Tsurushima, T. (1992), *Synthesis of a Germination self-inhibitor Levo Gloesporone and related compounds and evaluation of their activities*, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 524.
135. Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T.A. (1995), *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols.*, *Biochem.*, **34**, 16838-16851.
136. Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. (1998), *Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site.*, *Chem. Phys. Lipids*, **93**, 67-80.

137. Guo, Z.W., Sih, C.J. (1988), *Enzymatic synthesis of macrocyclic lactones*, J. Am. Chem. Soc., **110**, 1999-2001.
138. Robinson, K., Alston, M.J., Knowles, C.J., Cheetham, P.S.J., Motion, K.R. (1994), *An investigation into the factors influencing lipase-catalysed intramolecular lactonization in microaqueous systems*, Enzyme Microb. Technol., **16**, 855-863.
139. Gargouri, M., Drouet, P., Legoy, M.D. (2002), *Synthesis of a novel macrolactone by lipase-catalyzed intra-esterification of hydroxy-fatty acid in organic media*, J. Biotechnol., **92** (3), 259-266.
140. Inada, Y., Nishimura, H., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Saha, A.R., Saito, Y. (1984), *Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **122**, 845-850.
141. Makita, A., Nihira, T., Yamada, Y. (1987), *Lipase catalysed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvents*, Tetrahedron Lett., **28**, 805-808.
142. Kodera, Y., Furukawa, M., Yokoi, M., Kuno, H., Matsushita, M., Inada, Y. (1993), *Lactone synthesis from 16-hydroxyhexadecanoic acid ethyl ester in organic solvents catalysed with polyethylene glycol-modified lipase*, J. Biotechnol., **31**, 219-224.
143. Lobell, M., Schneider, M.P. (1993), *Lipase-catalysed formation of lactones via irreversible intramolecular acyl transfer*, Tetrahedron: Asymm., **4**, 1027-1030.
144. Dodson, G., Wlodawer, A. (1998), *Catalytic triads and their relatives.*, Trends Biochem. Sci., **23**, 347-352.
145. Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M. (1991), *Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from Geotrichum candidum*, Nature, **351** (6329), 761-764.

146. Monecke, P., Friedemann, R., Naumann, S., Csuk, R. (1998), *Molecular modelling studies on the catalytic mechanism of Candida rugosa lipase*, J. Mol. Model., **4**, 395-404.
147. Beer, H.D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., S., D. und Schmid, R.D. (1996), *Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants*, Protein Eng., **9** (6), 507-517.
148. Theil, F. (1997), *Enzyme in der organischen Synthese*, Heidelberg u.a.: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH.
149. Gerhartz, W., Yamamoto, Y.S., Kaudy, L., Rounsaville, J.F., Schulz, G. (1987), *Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry* (ed. Gerhartz, W., Yamamoto, Y.S., Kaudy, L., Rounsaville, J.F., Schulz, G.) **Vol. Vol. A9**, Weinheim: Verlag Chemie.
150. Kroschwitz, J.I., Howe-Grant, M. (1994), *Kirth-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* **Vol. 9**, New York: Wiley.
151. Schurig, V., Betschinger, F. (1992), *Metal-mediated Enantioselective Access to Unfunctionalized Aliphatic Oxiranes: Prochiral and Chiral Recognition*, Chem. Rev., **92**, 873.
152. Kolb, H.C., VanNieuwenhze, M.S., Sharpless, K.B. (1994), *Catalytic Asymmetric Dihydroxylation*, Chem. Rev., **94**, 2483.
153. Johnson, R.A., Sharpless, K.B. (1993), *Catalytic Asymmetric Synthesis* (ed. Ojima, I.), New York: Verlag Chemie.
154. Andrus, M.B., Poehlein, B.W. (2000), *Epoxidation of olefins with peracid at low temperature with copper catalysis*, Tetrahedron Lett., **41** (7), 1013 - 1014.
155. Sato, K., Aoki, M., Ogawa, M., Hashimoto, T., Panyella, D., Noyori, R. (1997), *A Halide-Free Method for Olefin Epoxidation with 30 % Hydrogen Peroxide*, Bull. Chem. Soc. Jpn., **70** (4), 905 - 916.

156. Marchand, A.P., Ganguly, B., Shukla, R., Krishnudu, K., Kumar, V.S., Watson, W.H., Bodige, S.G. (1999), *Experimental and Theoretical Investigations into the Stereoselectivities of Peracid Promoted Epoxidations of Substituted Norbornenes and Norbornadienes*, Tetrahedron, **55** (28), 8313 - 8322.
157. Moyna, G., Williams, H.J., Scott, A.I. (1996), *An improved procedure for the epoxidation of methyl cinnamate derivatives and production of acid sensitive epoxides*, Synth. Commun., **26** (11), 2235-2240.
158. Sonnet, P.E., Lankin, M.E., McNeill, G.P. (1995), *Reaction of dioxiranes with selected oleochemicals*, J. Am. Oil. Chem. Soc., **72**, 199-204.
159. Theil, F. (1997), *Enzyme in der organischen Synthese*, Heidelberg u.a.: Spektrum, Akademischer Verlag.
160. Björkling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O. (1990), *Lipase-mediated formation of peroxy-carboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1301-1303.
161. Björkling, F., Frykman, H., Godtfredsen, S.E., Kirk, O. (1992), *Lipase catalysed synthesis of peroxy-carboxylic acids and lipase mediated oxidations*, Tetrahedron, **48**, 4587-4592.
162. Kirk, O., Christensen, M.W., Damhus, T., Godtfredsen, S.E. (1994), *Enzyme catalysed degradation and formation of peroxy-carboxylic acids*, Biocatalysis, **11**, 65-77.
163. Rüsch gen. Klaas, M., Warwel, S. (1996), *Lipase-catalysed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation*, J. of Mol. Cat. A, **117**, 311-319.
164. Warwel, S., Rüsch gen. Klaas, M. (1995), *Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated carboxylic acids*, J. of Mol. Cat. B, **1**, 29-35.
165. Warwel, S., Rüsch gen. Klaas, M. (1997), *Perkohlensäurehalbester*, DE19738442 A1,

166. Rüschen gen. Klaas, M., Warwel, S. (1996), *Chemoenzymatic Epoxidation of unsaturated fatty acid esters and plant oils*, J. Am. Oil. Chem. Soc., **73** (11), 1453-1457.
167. Ruesch gen. Klaas, M., Warwel, S. (1998), *A three-step-one-pot chemoenzymatic synthesis of epoxyalkanolacylates*, Synth. Commun., **28** (2), 251-260.
168. Asinger, F., Fell, B., Hadik, G., Steffan, G. (1964), *"Kinetische Untersuchungen zur Epoxidierung von aliphatischen Alkenen mit Peressigsäure ergaben eine steigende Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substitution"*, Biochemistry, **97**, 1568.
169. Vogel, E., Haberland, U., Ick, J. (1970), *"regioselektive Epoxygenierung der stärker substituierten C=C-Doppelbindungen in nicht konjugierten Polymeren"*, Ang. Ch., **82**, 514.
170. Müller, E. (1981), *Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie*, 4 ed **Vol. 4/1a**, Stuttgart: Georg ThiemeVerlag.
171. Bartlett, P.D. (1950), *Recent work on the mechanism of peroxide reactions*, Rec. Chem. Progr., **11**, 47-51.
172. Reichardt, C. (1969), *Lösemittleffekte in der organischen Chemie*, Heidelberg: Verlag Chemie.
173. Kropf, H., Yazdanbakhch, M.R. (1974), *Organische Peroxide-XI- Zum Lösungsmittleinfluss bei der Epoxidierung von Olefinen mit Persäuren*, Tetrahedron, **30**, 3455-3359.
174. Isoda, H., Kitamoto, M., Shinmoto, H., Matsumura, M., Nakahara, T. (1997), *Microbial Extracellular Glycolipid Induction of Differentiation and Inhibition of the Protein Kinase C Activity of Human Promyelocytic Leukemia Cell Linie HL60*, Biosci. Biotech. Biochem., **61** (4), 609-614.

175. Tulloch, A.P., Maazurek, M. (1976), *¹³C Nuclear magnetic resonance spectroscopy of saturated, unsaturated and oxygenated fatty acid methyl esters*, *Lipids*, **11**, 228-234.
176. Gunstone, F.D., Pollard, M.R., Scrimgeour, C.M., Vedanayagam, H.S. (1977), *¹³C-nuclear magnetic resonance studies of olefinic fatty acids and esters*, *Chem. Phys. Lipids*, **18**, 115-129.
177. Johns, S.R., Leslie, D.R., Willing, R.J., Bishop, D.G. (1977), *Relaxation times of carboxylic acids*, *Austral. J. Chem.*, **30**, 813-822.
178. Bus, J., Sies, I., Lie Ken Jie, M.S.F. (1976), *¹³C-NMR of methyl, methylene and carbonyl carbon atoms of methyl alkenoates and alkynoates*, *Chem. Phys. Lipids*, **17**, 501-518.
179. Knothe, G., Bagby, M.O. (1995), *¹³C-NMR spectroscopy of unsaturated long-chain compounds; an evaluation of the unsaturated carbon signals as rational functions*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 615-620.
180. Lehmann, J. (1997), *Synthese von Alkinoliden und (Z)-Alkenoliden- ein Beitrag zu Struktur-Geruchs-Beziehungen*, Kiel: Dissertation.
181. Bascetta, E., Gunstone, F.D. (1985), *¹³C chemical shifts of long-chain epoxides, alcohols and hydroperoxides*, *Chem. Phys. Lipids*, **36**, 253-261.
182. Lie Ken Jie, M.S.F., Lam, C.K. (1995), *Ultrasound-assisted epoxidation of long-chain unsaturated fatty esters*, *Ultrasonic Sonochemistry*, **2**, 11-14.

7. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
$[E_0]$	anfängliche Enzymkonzentration
$[ES]$	Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes
$[M+\text{Na}]^+$	positives mit einem Natriumatom assoziiertes Molekülion
$[M-\text{H}]^-$	negatives deprotoniertes Molekülion
$[S]$	Substratkonzentration
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Blindprobe ohne Enzym
C-	Kohlenstoff-
C.A.	Lipase aus <i>Candida antartica</i>
C.A. _{imm}	immobilisierte Lipase aus <i>Candida antartica</i> (Novozym SP 435)
CD_2Cl_2	deutertes Dichlormethan
CD_3OD	deutertes Chloroform
Cel	Cellulase aus <i>Aspergillus niger</i>
CH	Clara Diastase
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dublett
d	Tage
DC	Dünnschicht-Chromatografie
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer
DFC	Dry-Flash-Chromatografie
dL	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-	geringe Tendenz zur Emulsionsbildung
E	Enzym

E+	starke Tendenz zur Emulsionsbildung
EA	Ethylacetat
EC	Enzyme Commission
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELSD	evaporative light-scattering detector
Eo	mittlere Tendenz zur Emulsionsbildung
ES	Enzym-Substrat-Komplex
E.S. _{imm.}	Esterase aus Schweineleber immobilisiert auf Eupergit
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAB	fast atom bombardement
FAB-neg.	negatives fast atom bombardement
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	(ω -1)-OH-Fettsäure: 17-L-Hydroxy- <i>cis</i> -9-octadecensäure
FS-1	Stereoisomer der FS (R_f =0,35, Abb. 42, S.77)
FS-2	Stereoisomer der FS (R_f =0,28, Abb. 42, S.77)
FS-ep	epoxidierte (ω -1)-OH-Fettsäure: 8-[3-(7-Hydroxy-heptyl)-oxiranyl]-octansäure
FS-ep-1	Stereoisomer der FS-ep (R_f =0,21, s.Abb. 43, S.77)
FS-ep-2	Stereoisomer der FS-ep (R_f =0,13, s.Abb. 43, S.77)
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung [ms^{-2}]
Gal	Galactomannase aus <i>Aspergillus niger</i> ,
GC	Gaschromatografie
GC/MS	Kopplung eines Geschromatografen mit einem Massenspektrometer
Gew. %	Gewichtsprozent
GH-A	Bezeichnung für den Clan einer Gruppe von Glukosidasen
GH-H	Bezeichnung für den Clan einer Gruppe von Glukosidasen

Gl.	Gleichung
GI50	Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt.
Glu	Glukose
Glu	Glutaminsäure
Glu-LS	Glukoselipid-Säure
h	Stunde
H	Wasserstoff
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
Hep G2	Tumorzelllinien (Leberkarzinom)
Hesp	Hesperidinase aus <i>Aspergillus niger</i>
His	Histidin
HMO2	Tumorzelllinien (Magenkarzinom)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie
inv.	Inversion
J	Kopplungskonstante
k_n ($n=1-6$)	Geschwindigkeitskonstanten für Hinreaktionen
k_{-n} ($n=1-6$)	Geschwindigkeitskonstanten für Rückreaktionen
Kap.	Kapitel
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K_M	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
konz.	konzentriert
kPa	Kilopascal
L	Liter
Lac	lactonisierte (ω -1)-OH-Fettsäure: 17-Methyl-oxa-2- <i>cis</i> -9-cycloheptadecenon
Lac-1a	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,46$ s.Abb. 43, S.77)
Lac-1b	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,42$ s.Abb. 43, S.77)
Lac-2a	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,38$ s.Abb. 43, S.77)

Lac-ep	epoxidiertes Lacton: 8-Methyl-9,19-dioxa-bicyclo[16.1.0 nonadecan]-10-on
Lac-ep-1	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,74$ s.Abb. 43, S.77)
Lac-ep-2	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,68$ s.Abb. 43, S.77)
Lac-ep-3	Stereoisomer des Lac ($R_f=0,60$ s.Abb. 43, S.77)
$L_{analytisch}$	Länge der analytischen Säule
LC50	Konzentration, die eine halbmaximale cytotoxische Wirkung zeigt und nach 24 h die initial vorliegende Zellzahl um die Hälfte reduziert.
Lip _{Schweinem.}	Lipase aus Schweinemägen
LM	Laufmittel
$L_{präparativ}$	Länge der präparativen Säule
m	Masseneinheit
M	molar
m	Multipllett
m/z	Massenzahl
Me-FS	methylierte (ω -1)-OH-Fettsäure
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimol
MPLC	Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatografie
MS	Massenspektroskopie
MTBE	tert-Butylmethylether
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nar	Naringinase aus <i>Penicillium decumbens</i>

Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NCI	Nuclear Control Institute
nm	Nanometer
n.b.	nicht bekannt
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Nebenprodukt
Nuc	Nukleophil
O	Sauerstoff
P	Brechen der Emulsion durch Zugabe von Phosphorsäure
P	Produkt
PeOH	Pentanol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionen
PS _{fl}	Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
q	Quartett
R _{1...3}	organische Verbindung
<i>r_{analytisch}</i>	Radius der analytischen Säule
ret.	Retention
R _f	Retention Factor
Rhi _{dal}	Lipase aus <i>Rhizopus dalamar</i>
Rhi _{niv}	Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i>
RP	reversed phase
<i>r_{präparativ}</i>	Radius der präparativen Säule
S	Schwefel
s	Singulett
<i>S</i>	Substrat
S.A.	Sulfataseaktivität
SL	natives Sophoroselipidgemisch
SLL-DEAC	17-L-([2-O-β-D-Glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl]-oxy)- <i>cis</i> -9-octadecensäure-1', 4''-lacton

SLS-DEAC 18:0	17-L-([2-O- β -D-Glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl]-oxy)-octadekansäure
SLS-DEAC 18:1	17-L-([2-O- β -D-Glucopyranosyl- β -D- glucopyranosyl]-oxy)- <i>cis</i> -9-octadecensäure
SLS-DEAC 18:2	17-L-([2-O- β -D-Glucopyranosyl- β -D- glucopyranosyl]-oxy)- <i>cis-cis</i> -9,7-octadiensäure
SLS-DEAC	native deacetylierte Sophoroselipid-Säure
SLS-DIAC	native diacetylierte Sophoroselipid-Säure
SLS-MOAC	native monoacetylierte Sophoroselipid-Säure
β -Glucor	β -Glucoronidase aus <i>Helix pomatia</i> Typ HP-2
T	Temperatur
t	Triplett
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Taka	Taka Diastase aus <i>Aspergillus oryzae</i>
TGI	Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt.
U	Unit
ÜZ	Übergangszustand
UV	ultraviolett
V	Brechen der Emulsion durch Erhöhung des Volumenanteils von Cyclohexan
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
v_{\max}	Sättigungsgeschwindigkeit
$X_{\text{analytisch}}$	Flussrate der analytischen Säule
$X_{\text{präparativ}}$	Flussrate der präparativen Säule
YM	yeast/manitol

Z	Emulsion entmischt sich nach 4h
z	Ladungszahl
ZP	Zwischenprodukt
β -Gluc	β -Glukosidase aus Mandeln
μ L	Mikroliter

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Sabine Hammen
Geburtstag:	29.07.1969
Geburtsort:	Herford
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

08.1975-06.1979	Grundschule Oetinghausen
08.1979-06.1985	Otto-Hahn-Realschule in Herford
08.1985-06.1988	Königin-Mathilde-Gymnasium in Herford

Ausbildung / Berufstätigkeit:

08.1988-06.1990	Ausbildung als technische Assistentin für Gestaltung an den Carl-Severing-Schulen in Bielefeld
10.1990-06.1991	Tätigkeit als Werbeassistentin bei Santea (Sanitär- und Heizungsfachhandel) in Hannover
10.1991-12.1997	Diplomstudiengang Chemie an der Universität Hannover
20.10.1994	Vordiplom
23.12.1997	Hauptdiplom
02.1998-05.1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover (Schadstoffemissionen aus Elektrobacköfen)
09.1998-09.2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig Anfertigung der Dissertation